

ÖZET

ORGANLARIN VE DOKULARIN MUHAFAZA EDİLMESİNE YÖNELİK YÖNTEM

- 5 Buluş, bir organ veya dokunun muhafaza edilmesine yönelik bir yöntem ile ilgili olup, organ veya dokunun, bir kallikrein inhibitörünün etkili bir miktarla temas ettirilmesini içermektedir ve buluş ayrıca bu tür bir yöntemde kullanılabilen çözeltiler ile ilgilidir. Ayrıca, ameliyat sırasında ve/veya bir sujuden organ çıkarılmasından sonra bir organın reperfüzyon hasarını azaltılmasına yönelik bir yöntem ile ilgili olup, organın bir organ saklama ve muhafaza çözeltisi
- 10 içerisine koyulmasını içermektedir, burada çözelti bir kallikrein inhibitörü içermektedir.

İSTEMLER

1. Bir organın muhafaza edilmesi ve/veya saklanmasıya yönelik bir bileşim olup, bileşim, fizyolojik olarak kabul edilebilir ex vivo bir organ muhafaza çözeltisi ve 53 ila 60 amino asitlik bir kallikrein bağlama polipeptiti içermektedir, burada kallikrein bağlama polipeptiti SEKANS KİMLİK NUMARASI:2'nin 3 ila 60 amino asitlerini içermektedir.

2. İstem 1'e göre bileşim olup, burada ex vivo organ muhafaza çözeltisi, çözeltisinin 1 litresi içerisinde aşağıdakileri içermektedir:

(i) 100 mmol K⁺- laktobiyonat, 25 mmol KH₂PO₄, 5 mmol MgSO₄, 30 mmol Rafinoz, 5 mmol adenozin, 3 mmol glutatyon, 100U insülin, 0.5 ml Baktrim (16 mg/ml), 8 mg deksametazon, 1 mM allopurinol ve yaklaşık 200,000 ila yaklaşık 300,000 değerindeki bir moleküler ağırlığa ve yaklaşık 0.4 ila 0.7 değerindeki bir ikame derecesine sahip 50 g hidroksietil nişastas

(ii) 30 ila 100 g/L %10 modifiye hidroksietil nişastas, 85 ila 145 mM NaCl, 3 ila 6 mM KCl, 1.0 ila 1.6 mM CaCl₂, 0.7 ila 1.3 mM KH₂PO₄, 0.9 ila 1.5 mM MgSO₄, 0.05 ila 5.0 mM allopurinol, 0.02 ila 2.0 mM desferrioksamin, 0.5 ila 10.0 mM glutatyon, 0.1 ila 5.0 µM nikardipen, 0.1 ila 5.0 mM adenozin, 1.0 ila 50.0 mM fruktoz, 1.0 ila 50.0 mM glukoz, 5 ila 250 U/L insülin, ve 2 ila 40 mM Moplar;

(iii) 50 g/L %10 modifiye hidroksietil nişasta, 115 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.30 mM CaCl₂, 1mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 1mM allopurinol, 1 mM desferrioksamin, 3 mM glutatyon, 2 µM nikardipen, 1 mM adenozin, 10 mM fruktoz, 10 mM glukoz, 100 U/L insülin, ve 20 mM Moplar;

(iv) 85 ila 145 mM NaCl, 3 ila 6 mM KCl, 1.0 ila 1.6 mM CaCl₂, 0.7 ila 1.3 mM KH₂PO₄, 0.9 ila 1.5 mM MgSO₄, ve 0.12 ila 1.2 mM adenozin; veya

(v) 115 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.30 mM CaCl₂, 1 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 1mM allopurinol, 1 mM desferrioksamin, 3 mM glutatyon, ve 0.12 mM adenozin.

3. Bileşimin ayrıca bir antioksidan içerdiği, İstem 1 veya 2'ye göre bileşim.

4. Yöntemin, organ veya dokunun, istemler 1 ila 3'ten herhangi birine göre bileşim ile temas ettirilmesini içerdiği, bir organ veya dokunun muhafaza edilmesine yönelik bir ex vivo yöntem.

- 5.** Yöntemin, organın, istemler 1 ila 3'ten herhangi birine göre bileşim ile temas ettirilmesini içerdiği, ameliyat sırasında ve/veya organın bir sujeden çıkarılmasından ardından bir organın reperfüzyon hasarının azaltılmasına yönelik bir ex vivo yöntem.
- 5 **6.** Organ veya dokunun kalp, akciğer, böbrek, pankreas, karaciğer, bağırsak, endotelial doku, vasküler doku veya cilt olduğu, istem 4 veya istem 5'e göre yöntem.

TARİFNAME

ORGANLARIN VE DOKULARIN MUHAFAZA EDİLMESİNE YÖNELİK YÖNTEM

5 İLGİLİ BAŞVURU

Bu başvuru, 28 Ağustos 2002 tarihinde dosyalanan, 60/407,004 numaralı U.S. Geçici Başvurusundan hak iddia etmektedir.

10 ÖNCEKİ TEKNİK

Donör organların yaşayabilirliğinin muhafaza edilmesi, organ nakli için önemli bir amaçtır. Tipik olarak, nakledilecek olan organ saklanmalıdır ve olası bir sevk edilmelidir. Saklama ve sevk sırasında organın hücresel yaşayabilirliğinin uzatılabilmesi, nakil operasyonunun başarısı için oldukça önemlidir. Muhafaza çözümleri, organın ömrü bakımından önemli bir rol oynamaktadır. Organların muhafaza edilmesine yönelik çözümler, Berdyaev ve meslektaşları tarafından 5,432,053 numaralı U.S. Patent Dokümanında, Belzer ve meslektaşları tarafından, 4,798,824, 4,879,283, ve 4,873,230 numaralı U.S. Patent Dokümanlarında; Taylor tarafından 5,405,742 numaralı U.S. Patent Dokümanında; Dohi ve meslektaşları tarafından 5,565,317 numaralı U.S. Patent Dokümanında; Stem ve meslektaşları tarafından 5,370,989 ve 5,552,267 numaralı U.S. Patent Dokümanlarında açıklananlar kapsamında. Ancak, organların muhafaza edilmesine yönelik yöntemler ve çözümler için bir ihtiyaç mevcuttur.

Protezler çok çeşitli biyolojik yollara dahil olmaktadır. Özellikle, kallikrein, plazmin, elastaz, ürokinaz plazminojen aktivatörü, trombin, insan lipoproteini ile ilişkili koagülasyon inhibitörü gibi serin proteazlar ve faktörler VIIa, IXa, Xa, XIa, ve XIIa gibi koagülasyon faktörleri, kan akışının, örneğin genel veya fokal iske mi, tümör invazyonu, fibrinoliz, perioperatif kan kaybı ve inflamasyonu etkileyen yollara dahil edilebilmektedir. Dolayısıyla, spesifik serin proteazların inhibitörleri, çeşitli iskemik hastalara yönelik poransitel ilaç hedefleri olarak dikkat çekmektedir.

Sığı karaciğerinden elde edilen bu tür bir inhibitör, yani aprotinin (ayrıca sığı pankreatik tripsin inhibitörü veya BPTI olarak da adlandırılmaktadır), örneğin bir koroner arter baypas aşı lama prosedürü sırasında CPB gören hastalardaki peroperatif kan kaybını ve transfüzyon ihtiyacını azaltılmasında profilaktik kullanıma yönelik olarak Birleşik Devletler'de onay almıştır. Aprotinin,

TRASYLOL® (Bayer Corporation Pharmaceutical Division, West Haven, Connecticut) ticari markası altında piyasada mevcuttur ve pankreatitin tedavisinde kullanılmak için onay almıştır. Aprotininin etkililiği, plazma kallikrein de dahil olmak üzere birçok serin proteazlar ve plazmini inhibe etmeye yönelik görece spesifik olmayan yetileri ile ilişkilendirilmektedir. Bu proteazlar, temas aktivasyon sisteminin (CAS) birkaç yolağından önemlidir.

CAS, başlangıçta, substratları (örneğin kaolin, cam, dekstran sülfat veya zarar görmüş kemik yüzeyleri) yüzeyine tüm kan temas ettiğinde aktif hale getirilmektedir. Bir serin proteaz olan kallikrein, nötrofiller, plazmin, koagülasyon ve çeşitli kininlerin aktivasyonuna yol açan CAS kaskadını başlatan bir plazma enzimidir. Kallikrein, temas aktivasyon kaskadında erken bir şekilde bir proteolitik olay tarafından aktif hale getirilene kadar bir inaktif molekül olarak dolaşımda olan bir zimogen (ön-kallikrein) olarak salgılanmaktadır.

Ancak, organların muhafaza edilmesi için spesifik kallikrein inhibitörlerin kullanılması bir şekilde ispat edilememiştir.

BULUŞUN KISA AÇIKLAMASI

Bu buluş, örneğin kallikrein gibi serin proteazları inhibe eden peptitlerin keşfine dayanmakta olup, bunlar, nakil bekleyen bir organın muhafaza edilmesinde başarılı bir şekilde kullanılabilmektedir. Daha spesifik olarak, buluş, bir organ veya dokunun muhafaza edilmesi için bir yöntemde kallikrein inhibitörlerinin kullanılması yönelik yöntemler ve bu tür bir kullanıma yönelik bileşimler sağlamaktadır. Buluş ayrıca, konağından çıkarılmış olan bir organ veya dokudaki reperfüzyon hasarı veya zedelenmesinin azaltılmasını inhibe edilmesi veya önlenmesine yönelik yöntemler ve bu tür bir kullanıma yönelik bileşimler ile ilgilidir. Tercih edilen kallikrein peptitleri, Markland ve meslektaşları tarafından 6,333,402 ve 6,057,287 numaralı Birleşik Devletler Patent Dokümanlarında açıklananlar kapsamaktadır.

Mevcut tarifname, şu amino asit sekansları içeren bir polipeptiti içeren bileşimleri açıklamaktadır.

Xaa1 Xaa2 Xaa3 Xaa4 Cys Xaa6 Xaa7 Xaa8 Xaa9 Xaa10 Xaa11 Gly Xaa13 Cys Xaa15
Xaa16 Xaa17 Xaa18 Xaa19 Xaa20 Xaa21 Xaa22 Xaa23 Xaa24 Xaa25 Xaa26 Xaa27 Xaa28
Xaa29 Cys Xaa31 Xaa32 Phe Xaa34 Xaa35 Gly Gly Cys Xaa39 Xaa40 Xaa41 Xaa42 Xaa43
Xaa44 Xaa45 Xaa46 Xaa47 Xaa48 Xaa49 Xaa50 Cys Xaa52 Xaa53 Xaa54 Cys Xaa56 Xaa57

Xaa58 (SEKANS KİMLİK NUMARASI:1),

5 burada Xaa1, Xaa2, Xaa3, Xaa4, Xaa56, Xaa57 veya Xaa58'den her biri bireysel olarak bir amino asittir veya mevcut değildir; Xaa6, Xaa7, Xaa8, Xaa9, Xaa20, Xaa24, Xaa25, Xaa26, Xaa27, Xaa28, Xaa29, Xaa41, Xaa42, Xaa44, Xaa46, Xaa47, Xaa48, Xaa49, Xaa50, Xaa52, Xaa53 ve Xaa54 herhangi bir amino asit olabilmektedir; Xaa10 ise şublardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Asp ve Glu; Xaa11 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Asp, Gly, Ser, Val, Asn, Ile, Ala ve Thr, Xaa13 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Arg, His, Pro, Asn, Ser, Thr, Ala, Gly, Lys ve Gln; Xaa15 10 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Arg, Lys, Ala, Ser, Gly, Met, Asn ve Gln; Xaa16 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Ala, Gly, Ser, Asp ve Asn; Xaa17 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Ala, Asn, Ser, Ile, Gly, Val, Gln ve Thr; Xaa18 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: His, Leu, Gln ve Ala; Xaa19 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Pro, Gln, Leu, Asn ve Ile; Xaa21 15 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Trp, Phe, Tyr, His ve Ile; Xaa22 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Tyr ve Phe; Xaa23 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Tyr ve Phe; Xaa31 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Ala, Val, Leu, Ile ve Thr; Xaa32 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Glu, Gln, Asp, Asn, Pro, Thr, Leu, Ser, Ala, Gly ve Val; Xaa34 20 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Thr, Ile, Ser, Val, Ala, Asn, Gly ve Leu; Xaa35 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Tyr, Trp ve Phe; Xaa39 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Glu, Gly, Ala, Ser ve Asp; Xaa40 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Gly ve Ala; Xaa43 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Asn ve Gly; Xaa45 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Phe ve Tyr; ve burada söz konusu polipeptit kallikreini inhibe etmektedir ve 25 tarifname ayrışma, bu bileşimlerin kullanıldığı yönelik yöntemleri açıklamaktadır buluş ekli istemler tarafından tanımlanmaktadır

Bir referans yönde, spesifik amino asit pozisyonları şunlar olabilmektedir: Xaa6 Ala 30 olabilmektedir, Xaa7 Phe olabilmektedir, Xaa8 Lys olabilmektedir, Xaa9 Ala olabilmektedir, Xaa10 Asp olabilmektedir, Xaa11 Asp olabilmektedir, Xaa13 Pro olabilmektedir, Xaa15 Arg olabilmektedir, Xaa16 Ala olabilmektedir, Xaa17 Ala olabilmektedir, Xaa18 His olabilmektedir, Xaa19 Pro olabilmektedir, Xaa20 Arg olabilmektedir, Xaa24 Asn olabilmektedir, Xaa25 Ile olabilmektedir, Xaa26 Phe olabilmektedir, Xaa27 Thr olabilmektedir, Xaa28 Arg olabilmektedir, 35 Xaa29 Gln olabilmektedir, Xaa31 Glu olabilmektedir, Xaa32 Glu olabilmektedir, Xaa34 Ile

olabilmektedir, Xaa35 Tyr olabilmektedir, Xaa39 Glu olabilmektedir, Xaa41 Asn olabilmektedir, Xaa42 Arg olabilmektedir, Xaa44 Arg olabilmektedir, Xaa46 Glu olabilmektedir, Xaa47 Ser olabilmektedir, Xaa48 Leu olabilmektedir, Xaa49 Glu olabilmektedir, ve/veya Xaa50 Glu olabilmektedir; bu pozisyonlardaki herhangi bir spesifik amino asit, bireysel olarak veya 5 açılanan bir veya daha fazla pozisyonadki bir veya daha fazla amino asit ile kombinasyon halinde meydana gelebilmektedir.

Bir referans yönünde, mevcut tarifname, SEKANS KİMLİK NUMARASI:1'de açılanan bir polipeptit içeren bir bileşimi açıklamaktadır öyle ki yandaki amino asitlerden ikisi veya daha 10 fazlası şu şekilde tanımlanmaktadır Xaa10 Asp olabilmektedir; Xaa11 Asp olabilmektedir; Xaa13 Pro olabilmektedir; Xaa15 Arg olabilmektedir; Xaa16 Ala olabilmektedir; Xaa17 Ala olabilmektedir; Xaa18 His olabilmektedir; Xaa19 Pro olabilmektedir; Xaa21 Trp olabilmektedir; Xaa22 Phe olabilmektedir; Xaa23 Phe olabilmektedir; Xaa31 Glu olabilmektedir; Xaa32 Glu olabilmektedir; Xaa34 Ile olabilmektedir; Xaa35 Tyr olabilmektedir; Xaa39 Glu olabilmektedir; 15 Xaa40 Gly olabilmektedir; Xaa43 Asn olabilmektedir; ve Xaa45 Phe olabilmektedir ve tarifname ayrıca bu bileşimlerin kullanıldığı yönelik yöntemleri açıklamaktadır Bir başka referans yönünde, yandaki amino asitler pozisyonlarından beşi veya daha fazlası şu şekilde tanımlanmaktadır Xaa10 Asp olabilmektedir; Xaa11 Asp olabilmektedir; Xaa13 Pro olabilmektedir; Xaa15 Arg olabilmektedir; Xaa16 Ala olabilmektedir; Xaa17 Ala olabilmektedir; 20 Xaa18 His olabilmektedir; Xaa19 Pro olabilmektedir; Xaa21 Trp olabilmektedir; Xaa22 Phe olabilmektedir; Xaa23 Phe olabilmektedir; Xaa31 Glu olabilmektedir; Xaa32 Glu olabilmektedir; Xaa34 Ile olabilmektedir; Xaa35 Tyr olabilmektedir; Xaa39 Glu olabilmektedir; Xaa40 Gly olabilmektedir; Xaa43 Asn olabilmektedir; ve Xaa45 Phe olabilmektedir. Referans yönünde, 10 veya daha fazla amino asit şu şekilde tanımlanmaktadır Xaa10 Asp olabilmektedir; Xaa11 Asp olabilmektedir; Xaa13 Pro olabilmektedir; Xaa15 Arg olabilmektedir; Xaa16 Ala olabilmektedir; Xaa17 Ala olabilmektedir; Xaa18 His olabilmektedir; Xaa19 Pro olabilmektedir; Xaa21 Trp olabilmektedir; Xaa22 Phe olabilmektedir; Xaa23 Phe olabilmektedir; Xaa31 Glu olabilmektedir; Xaa32 Glu olabilmektedir; Xaa34 Ile olabilmektedir; Xaa35 Tyr olabilmektedir; Xaa39 Glu olabilmektedir; Xaa40 Gly olabilmektedir; Xaa43 Asn olabilmektedir; ve Xaa45 Phe olabilmektedir. Bir başka yapılandırılarda, 15 veya daha fazla amino asit şu şekilde tanımlanmaktadır Xaa10 Asp olabilmektedir; Xaa11 Asp olabilmektedir; Xaa13 Pro olabilmektedir; Xaa15 Arg olabilmektedir; Xaa16 Ala olabilmektedir; Xaa17 Ala olabilmektedir; Xaa18 His olabilmektedir; Xaa19 Pro olabilmektedir; Xaa21 Trp olabilmektedir; Xaa22 Phe olabilmektedir; Xaa23 Phe olabilmektedir; Xaa31 Glu olabilmektedir; Xaa32 Glu olabilmektedir; Xaa34 Ile olabilmektedir; Xaa35 Tyr olabilmektedir; 35

Xaa39 Glu olabilmektedir; Xaa40 Gly olabilmektedir; Xaa43 Asn olabilmektedir; ve Xaa45 Phe olabilmektedir.

5 Bir referans yönünde, tarifname SEKANS KİMLİK NUMARASI:1 tarafından tanımlanan bir polipeptit içeren bir bileşimi açıklamaktadır öyle ki mevcut olması durumunda Xaa3 Ser'dir, Xaa2 His'tir, Xaa1 Met'tir, Xaa56 Thr'dir, Xaa57 Arg'dir ve/veya Xaa58 Asp'dir ve tarifname ayrıca bu tür bileşimlerin kullanıldığı yönelik yöntemleri açıklamaktadır

10 Bir başka yapılandırılabilir buluş, yandakilere ait aa 3 ila 60 ile birlikte amino asit sekansını içeren bir polipeptit içeren bir bileşim ile ilgilidir:

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEKANS KİMLİK NUMARASI:2) ve buluş ayrıca, bu tür bileşimlerin, özellikle bir Kunitz alanı içeren 53 ila 60 amino asitlerin bir 15 kallikrein bağlama polipeptitini içeren bir bileşimin kullanıldığı yönelik yöntemler ile ilgilidir, burada Kunitz alanı pozisyonlar 5 ve 55; 14 ve 38; ve 30 ve 51'deki sisteinler arasındaki disülfid bağlarına yönelik potansiyeli içermektedir (sığılabilir pankreatik tripsin inhibitörüne (BPTI) karşı gelen amino asit pozisyonlarına göre) ve bileşim ayrıca şunları içermektedir:

20 His ve Pro'dan seçilen 13 numaralı amino asit;
Ala ve Gly'den seçilen 16 numaralı amino asit;
Ala, Asn ve Ser'den seçilen 17 numaralı amino asit;
His ve Leu'dan seçilen 18 numaralı amino asit; ve
Gln, Leu ve Pro'dan seçilen 19 numaralı amino asit (SEKANS KİMLİK NUMARASI:23).

25 Belirli bir yapılandırılabilir buluş, mevcut buluş, bir Kunitz alanı içeren 53 ila 60 amino asitlerin bir kallikrein bağlama polipeptitini içeren bir bileşim ile ilgilidir, burada Kunitz alanı pozisyonlar 5 ve 55; 14 ve 38; ve 30 ve 51'deki sisteinler arasındaki disülfid bağlarına yönelik potansiyel içermektedir (sığılabilir pankreatik tripsin inhibitörüne (BPTI) karşı gelen amino asit 30 pozisyonlarına göre) ve bileşim ayrıca aşağıdakileri içermektedir:

His ve Pro'dan seçilen 13 numaralı amino asit;
Lys ve Arg'dan seçilen 15 numaralı amino asit;
Ala ve Gly'den seçilen 16 numaralı amino asit;
35 Ala, Asn ve Ser'den seçilen 17 numaralı amino asit;

His ve Leu'dan seçilen 18 numaralı amino asit; ve
Gln, Leu ve Pro'dan seçilen 19 numaralı amino asit,
31 numaralı amino asit Glu'dur;
Glu ve Gln'den seçilen 32 numaralı amino asit;
5 Ser, Thr ve Ile'den seçilen 34 numaralı amino asit; ve
Gly, Glu ve Ala'dan seçilen 39 numaralı amino asit (SEKANS KİMLİK NUMARASI:24).

Belirli bir yapılandırılma, mevcut buluş, bir Kunitz alanı içeren 53 ila 60 amino asitlerin bir
kallikrein bağlama polipeptidini içeren bir bileşim ile ilgilidir, burada Kunitz alanı pozisyonlar 5
10 ve 55; 14 ve 38; ve 30 ve 51'deki bir sisteini içermektedir (sığıl pankreatik tripsin
inhibitörüne (BPTI) karşı gelen amino asit pozisyonlarına göre) ve bileşim ayrıca
aşağıdakileri içermektedir:

His ve Pro'dan seçilen 13 numaralı amino asit;
15 Lys ve Arg'dan seçilen 15 numaralı amino asit;
Ala ve Gly'den seçilen 16 numaralı amino asit;
Ala, Asn ve Ser'den seçilen 17 numaralı amino asit;
His ve Leu'dan seçilen 18 numaralı amino asit; ve
Gln, Leu ve Pro'dan seçilen 19 numaralı amino asit,
20 31 numaralı amino asit Glu'dur;
Glu ve Gln'den seçilen 32 numaralı amino asit;
Ser, Thr ve Ile'den seçilen 34 numaralı amino asit; ve
Gly, Glu ve Ala'dan seçilen 39 numaralı amino asit (SEKANS KİMLİK NUMARASI:24).

25 Belirli bir yapılandırılma, Kunitz alanı sunlardan oluşan gruptan seçilmektedir:

KKII/3 #1 (SEKANS KİMLİK NUMARASI:24)
KKII/3 #2 (SEKANS KİMLİK NUMARASI:25)
KKII/3 #3 (SEKANS KİMLİK NUMARASI:26)
30 KKII/3 #4 (SEKANS KİMLİK NUMARASI:27)
KKII/3 #5 (SEKANS KİMLİK NUMARASI:28)
KKII/3 #6 (SEKANS KİMLİK NUMARASI:29)
KKII/3 #7 (SEKANS KİMLİK NUMARASI:30)
KKII/3 #8 (SEKANS KİMLİK NUMARASI:31)
35 KKII/3 #9 (SEKANS KİMLİK NUMARASI:32) ve

Tablo 1’de açıklanmıştır.

- 5 Burada açıklanan her bir bileşim, buluşun yöntemlerinde kullanılabilmektedir. Dahası burada açıklanan bileşikler, burada açıklanan indikasyonlar veya yöntemler için bir ilaç veya bileşimin imalatında kullanılabilmektedir.

ŞEKİLLERİN KISA AÇIKLAMASI

10

Şekil 1, özellikle CABG prosedürü, örneğin kardiyopulmoner baypas (CPB; Baypas Aparatı) gibi ekstra korporel kan dolaşımını kapsadığında, bir koroner arter baypas aşılması (CABG) prosedürü ile ilişkilendirilenler gibi, yumuşak doku veya kemik dokusu travmasıyla maruz kalan bir hastada ortaya çıkabilen temas aktivasyon sistemi ve sistemik inflamatuvar yanıt (SIR) dahil olan başlıca çoklu yollar ve ilgili olayları basitleştirilmiş bir diyagramdır. Oklar, kaskad içerisinde bir bileşen veya olaydan bir başka bileşen veya olaya doğru olan aktivasyonu göstermektedir. Her iki yöndeki oklar, her iki yönde bileşenlerin veya olayların aktivasyon etkilerini göstermektedir. Kesik oklar, bir bileşen veya olayın bir başka bileşen veya olayın aktivasyonuna olasılıkla katıldığını göstermektedir. Kısaltmalar şu şekildedir: “tPA” = doku plazminojen aktivatörü; “C5a” = kompleman sisteminin bir protein bileşeni; “FXIIa” = aktif kallikreinin oluşturulmasına yönelik ön-kallikreinin aktivatör proteini; “Dışsal” = dışsal koagülasyon sistemi; “İçsel” = içsel koagülasyon sistemi.

20

Şekil 2, plazmid pPIC-K503 içerisinde buluşun bir kalliklerin inhibitör (“KI”) polipeptidine yönelik bir DNA bölümünü ve çözünen ilgili amino asidi göstermektedir. Eklenmiş DNA, kutulu alan tarafından çevrelenen amino asit sekansıya sahip PEP-1 KI polipeptitinin amino terminusuna çerçeve içerisinde füzyonlanan *accharomyces cerevisiae* (altı çizilmiş) mata prepro sinyal peptidini kodlamaktadır. Kutulu alanda gösterilen PEP-1 KI polipeptitinin amino asit sekansı SEKANS KİMLİK NUMARASI:2’dir ve KI polipeptitinin ilgili nükleotit kodlama sekansı SEKANS KİMLİK NUMARASI:3’tür. Kesikli oklar, sekanslama kalıplarının meydana getirilmesinde kullanılan AOX bölgelerindeki iki PCR primeri sekanslarının yerini ve yönünü göstermektedir. Şekildeki tüm nükleotit sekansının DNA sekansı füzyon proteinine yönelik yapışıl kodlama sekansı içerir ve SEKANS KİMLİK NUMARASI:35 olarak belirtilmektedir. Sekansın altı çizili bölümü, bir tam prob sekansı göstermektedir. *Bst*BI ve *Eco*RI, sekanstaki ilgili palindromik, hekzamerik, restriksiyon endonükleazların yerlerini göstermektedir. Yıldızlar translasyonel stop

35

kodonların işaret etmektedir.

Şekil 3, buluşun tercih edilen yapılandırmalarına ait amino asit sekansların bir hizasını göstermektedir.

5 BULUŞUN AYRINTILI AÇIKLAMASI

Buluşun tercih edilen yapılandırmaların bir açıklaması aşağıdaki gibidir.

10 Buluş, nakil bekliyor olanlar gibi organların ve dokuların muhafaza edilmesine yönelik geliştirilmiş yöntemlerde kullanılanlara mücadele eden bir spesifikite ile plazma kallikreini inhibe eden kallikrein inhibitör (KI) polipeptitlerinin leşfine ve istemlerde tanımlandığı üzere ilgili yöntemlere dayanmaktadır. Buluş ayrıca, konağından çıkarılmış olan bir organ veya dokudaki reperfüzyon hasarı veya zedelenmesinin azaltılmasını, inhibe edilmesi veya önlenmesine yönelik yöntemler ve bunlara yönelik bileşimler ile ilgilidir.

15

Buluşta Kullanılabilen Polipeptitler

Buluşta kullanılabilen KI polipeptitleri Kunitz alan polipeptitlerini içermektedir. Bir yapılandırmada bu Kunitz alanların insan lipoproteini ile ilişkili koagülasyon inhibitör (LACI) 20 proteininin Kunitz alanı'na ait kimlik yapıları içeren değişken formlarıdır. LACI, paradigma Kunitz alanları olan üç iç, iyi tanımlanmış peptit döngü yapıları içermektedir (Girard, T. ve meslektaşları, 1989. Nature, 338:518-520). LACI'nın üç Kunitz alanı, istisnai bir afiniteye sahip olmasa da kalliklerine bağlanma ve bunu inhibe etme yeteneğini sunmaktadır. Burada 25 açıklanan LACI'nın Kunitz alanı'nın değişkenleri, artan bir afinite ve spesifikite ile tanımlanmış ve izole edilmiştir ve kallikreine bağlanmıştır (bakınız örneğin 5,795,865 ve 6,057,287 numaralı U.S. Patent Dokümanları). Buluşta kullanılabilen polipeptit, SEKANS KİMLİK NUMARASI:2'ye ait amino asitler 3 ila 60 tarafından tanımlanan amino asit sekansına sahiptir.

30 Kallikrein bağlama polipeptitleri, terapötik veya tanısal moleküllerin, örneğin organ dokusu, hücreler veya tam organizmalarda kalliklerine hedeflenmesi için kullanılabilir. Terapötik veya tanısal amaçlara yönelik hedeflenmiş dağılım bu tür yöntemleri teknikte uzman bir kişi tarafından bilinecektir. Örneğin, hedeflenmiş kallikrein bağlama polipeptitleri, kalliklerinin etkilerinden dolayı hasar görmüş olan bir organın belirlenmesi için teknikte uzman bir kişi tarafından kullanılabilir veya kallikrein, buluşun kallikrein bağlama polipeptitleri 35 kullanarak belirli bir terapötik ajanın etkilerine yönelik olarak hedeflenebilir.

Buluştaki kullanılabilen her polipeptit kallikreini bağlamaktadır. Tercih edilen yapılandırmalarda, polipeptitler, teknikte bilinen kallikrein bağlama ve inhibisyon tahlilleri kullanılarak belirlendiği üzere kallikrein inhibitörleridir (KI). Burada açılanan değişken Kunitz alan polipeptitlerine ait kallikreine yönelik artmış afinite ve spesifite, bu tür prosedürler geçiren hastalarda perioperatif kan kaybı ve/veya SIR'nin önlenmesi veya azaltılması için CPB'de ve özellikle CABG cerrahi prosedürlerinde kullanılmaları yönelik temeli sağlamaktadır. Buluşta kullanılan KI polipeptitleri, aslen kallikrein bağlama yetisine yönelik olarak faj görüntüleme kütüphanelerinin taranmasıyla elde edilen bir değişken Kunitz alan polipeptitsinin amino asit sekansına sahip olabilmektedir veya bunu içerebilmektedir.

Burada açılanan KI polipeptitleri, şu amino asit sekansı içeren bir Kunitz alan polipeptitini içermektedir:

Xaa1 Xaa2 Xaa3 Xaa4 Cys Xaa6 Xaa7 Xaa8 Xaa9 Xaa10 Xaa11 Gly Xaa13 Cys Xaa15 Xaa16
Xaa17 Xaa18 Xaa19 Xaa20 Xaa21 Xaa22 Xaa23 Xaa24 Xaa25 Xaa26 Xaa27 Xaa28 Xaa29
Cys Xaa31 Xaa32 Phe Xaa34 Xaa35 Gly Gly Cys Xaa39 Xaa40 Xaa41 Xaa42 Xaa43 Xaa44
Xaa45 Xaa46 Xaa47 Xaa48 Xaa49 Xaa50 Cys Xaa52 Xaa53 Xaa54 Cys Xaa56 Xaa57 Xaa58
(SEKANS KİMLİK NUMARASI:1)

"Xaa", birçok farklı amino asitten herhangi biri olabilen bir peptit zincirindeki bir konuma işaret etmektedir. Örneğin, burada açılanan KI peptitlerine yönelik olarak, Xaa10 Asp veya Glu olabilmektedir; Xaa11 Asp, Gly, Ser, Val, Asn, Ile, Ala veya Thr olabilmektedir; Xaa13 Pro, Arg, His, Asn, Ser, Thr, Ala, Gly, Lys veya Gln olabilmektedir; Xaa15 Arg, Lys, Ala, Ser, Gly, Met, Asn veya Gln olabilmektedir; Xaa16 Ala, Gly, Ser, Asp veya Asn olabilmektedir; Xaa17 Ala, Asn, Ser, Ile, Gly, Val, Gln veya Thr olabilmektedir; Xaa18 His, Leu, Gln veya Ala olabilmektedir; Xaa19 Pro, Gln, Leu, Asn veya Ile olabilmektedir; Xaa21 Trp, Phe, Tyr, His veya Ile olabilmektedir; Xaa31 Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Ala, Val, Leu, Ile veya Thr olabilmektedir; Xaa32 Glu, Gln, Asp, Asn, Pro, Thr, Leu, Ser, Ala, Gly veya Val olabilmektedir; Xaa34 Ile, Thr, Ser, Val, Ala, Asn, Gly veya Leu olabilmektedir; Xaa35 Tyr, Trp veya Phe olabilmektedir; Xaa39 Glu, Gly, Ala, Ser veya Asp olabilmektedir. Amino asitler Xaa6, Xaa7, Xaa8, Xaa9, Xaa20, Xaa24, Xaa25, Xaa26, Xaa27, Xaa28, Xaa29, Xaa41, Xaa42, Xaa44, Xaa46, Xaa47, Xaa48, Xaa49, Xaa50, Xaa52, Xaa53 ve Xaa54 herhangi bir amino asit olabilmektedir. İlave olarak, SEKANS KİMLİK NUMARASI:1'in ilk dört ve en az üç amino asitlerinden her biri, tercihe bağlı olarak mevcut olabilmektedir veya olmayabilmektedir ve mevcut olması durumunda ise herhangi bir amino asit olabilmektedir.

SEKANS KİMLİK NUMARASI:1'e göre tanımlanan peptitler, kallikreine bağlanan veya bunu inhibe eden bir polipeptit dizisini meydana getirmektedir. Peptit sekansındaki değişken pozisyon sayısının arttıkça veya bir değişken pozisyonundaki olası amino asitlerin sayısının arttıkça KI'ların çeşitliliği de artmaktadır. Örneğin, tarifnamenin bir yönünde, mevcut yöntemlerde ve bileşimlerde kullanılabilen bir KI polipeptiti, şu değişken pozisyonlara sahiptir: Xaa11 Asp, Gly, Ser veya Val olabilmektedir; Xaa13 Pro, Arg, His veya Asn olabilmektedir; Xaa15 Arg veya Lys olabilmektedir; Xaa16 Ala veya Gly olabilmektedir; Xaa17 Ala, Asn, Ser veya Ile olabilmektedir; Xaa18 His, Leu veya Gln olabilmektedir; Xaa19 Pro, Gln veya Leu olabilmektedir; Xaa21 Trp veya Phe olabilmektedir; Xaa31 Glu'dur; Xaa32 Glu veya Gln olabilmektedir; Xaa34 Ile, Thr veya Ser olabilmektedir; Xaa35 Tyr'dir; ve Xaa39 Glu, Gly veya Ala olabilmektedir.

Tarifnamenin daha spesifik bir yönü, değişken pozisyonlardaki şu amino asitler tarafından tanımlanmaktadır: Xaa10 Asp'dir; Xaa11 Asp'dir; Xaa13 Pro veya Arg olabilmektedir; Xaa15 Arg'dir; Xaa16 Ala veya Gly olabilmektedir; Xaa17 Ala'dır; Xaa18 His'dir; Xaa19 Pro'dur; Xaa21 Trp'dir; Xaa31 Glu'dur; Xaa32 Glu'dur; Xaa34 Ile veya Ser olabilmektedir; Xaa35 Tyr'dir; ve Xaa39 Gly'dir.

Burada açıklanan yöntemlerde ve bileşimlerde kullanılabilen KI polipeptitleri, bir Kunitz alanı içermektedir. SEKANS KİMLİK NUMARASI:1 tarafından kapsanan sekansların bir alt kümesi, şunlar tarafından açıklanmaktadır (gösterilmemesi durumunda, "Xaa" SEKANS KİMLİK NUMARASI:1 için izin verilen amino asitlerin aynı kümesine işaret etmektedir):

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Xaa10 Xaa11 Gly Xaa13 Cys Xaa15 Xaa16 Xaa17 Xaa18 Xaa19 Arg Xaa21 Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Xaa31 Xaa32 Phe Xaa34 Xaa35 Gly Gly Cys Xaa39 Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEKANS KİMLİK NUMARASI:36).

Burada açıklanan KI peptitlerinin spesifik ve belirli örnekleri aşağıdaki gibidir, burada belirtilen birinci KI peptiti özgündür:

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEKANS KİMLİK NUMARASI:2'nin amino asitleri 3 ila 60),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Lys Ala Asn His Leu Arg Phe Phe
Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg
Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEKANS KİMLİK NUMARASI:4).

5

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala Asn His Gln Arg Phe Phe
Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Thr Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg
Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEKANS KİMLİK NUMARASI:5),

10

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala Asn His Gln Arg Phe Phe
Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Gln Phe Thr Tyr Gly Gly Cys Ala Gly Asn Gln Asn Arg
Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEKANS KİMLİK NUMARASI:6),

15

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala Ser Leu Pro Arg Phe Phe
Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg
Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEKANS KİMLİK NUMARASI:7),

20

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala Asn His Gln Arg Phe Phe
Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg
Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEKANS KİMLİK NUMARASI:8),

25

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Gly Ala His Leu Arg Phe Phe
Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg
Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEKANS KİMLİK NUMARASI:9),

30

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Arg Cys Lys Gly Ala His Leu Arg Phe Phe
Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg
Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEKANS KİMLİK
NUMARASI:10),

35

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Gly Gly Arg Cys Arg Gly Ala His Pro Arg Trp Phe
Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg
Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEKANS KİMLİK
NUMARASI:11),

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe
Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg
Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEKANS KİMLİK
NUMARASI:12),

5

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Val Gly Arg Cys Arg Gly Ala His Pro Arg Trp Phe
Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg
Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEKANS KİMLİK
NUMARASI:13),

10

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Val Gly Arg Cys Arg Gly Ala Gln Pro Arg Phe Phe
Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg
Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEKANS KİMLİK
NUMARASI:14),

15

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Ser Cys Arg Ala Ala His Leu Arg Trp Phe
Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg
Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEKANS KİMLİK
NUMARASI:15),

20

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Glu Gly Gly Ser Cys Arg Ala Ala His Gln Arg Trp Phe
Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg
Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEKANS KİMLİK
NUMARASI:16),

25

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Gly Ala His Leu Arg Phe Phe
Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg
Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEKANS KİMLİK
NUMARASI:17),

30

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Arg Gly Ala Leu Pro Arg Trp Phe
Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg
Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEKANS KİMLİK
NUMARASI:18),

35

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Ser Gly Asn Cys Arg Gly Asn Leu Pro Arg Phe Phe
Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg
Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEKANS KİMLİK
NUMARASI:19),

5

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Ser Gly Arg Cys Arg Gly Asn His Gln Arg Phe Phe
Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg
Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEKANS KİMLİK
NUMARASI:20),

10

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Gly Gly Arg Cys Arg Ala Ile Gln Pro Arg Trp Phe
Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg
Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEKANS KİMLİK
NUMARASI:21),

15

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Arg Cys Arg Gly Ala His Pro Arg Trp Phe
Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg
Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEKANS KİMLİK
NUMARASI:22).

20

Şekil 3, bu sekanslar bir amino asit sekans dizisini oluşturmaktadır.

Mevcut buluşta kullanılan diğer KI polipeptitleri şunları kapsamaktadır.

25 Arg Pro Asp Phe Cys Leu Glu Pro Pro Tyr Thr Gly Pro Cys Lys Ala Arg Ile Ile Arg Tyr Phe
Tyr Asn Ala Lys Ala Gly Leu Cys Gln Thr Phe Val Tyr Gly Gly Cys Arg Ala Lys Arg Asn Asn
Phe Lys Ser Ala Glu Asp Cys Met Arg Thr Cys Gly Gly Ala (SEKANS KİMLİK NUMARASI:23),

30 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala Ser Leu Pro Arg Phe Phe
Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg
Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEKANS KİMLİK
NUMARASI:24),

35 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Lys Ala Asn His Leu Arg Phe Phe
Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg

Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEKANS KİMLİK
NUMARASI:25),

5 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala Asn His Gln Arg Phe Phe
Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Thr Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg
Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEKANS KİMLİK
NUMARASI:26),

10 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala Asn His Gln Arg Phe Phe
Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Gln Phe Thr Tyr Gly Gly Cys Ala Gly Asn Gln Asn Arg
Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEKANS KİMLİK
NUMARASI:27),

15 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala Ser Leu Pro Arg Phe Phe
Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg
Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEKANS KİMLİK
NUMARASI:28),

20 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala Asn His Gln Arg Phe Phe
Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg
Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEKANS KİMLİK
NUMARASI:29),

25 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala Asn His Gln Arg Phe Phe
Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg
Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEKANS KİMLİK
NUMARASI:30),

30 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala Asn His Gln Arg Phe Phe
Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg
Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEKANS KİMLİK
NUMARASI:31),

35 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala Asn His Gln Arg Phe Phe
Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg

Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEKANS KİMLİK NUMARASI:32),

5 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Gly Ala His Leu Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEKANS KİMLİK NUMARASI:33),

10 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Lys Ala Ile Met Lys Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEKANS KİMLİK NUMARASI:34).

Bu sekanslar, aşağıdaki Tablo 1’de özetlenmektedir.

15

TABLO 1: İnsan plazma kallikreine bağlanma için seçilen LACI(K1) değişkenlerinin amino asit sekansları

	13	16	17	18	19	31	32	34	39(a)
KKII/3#1 (SEKANS KİMLİK NUMARASI:24)	H	A	S	L	P	E	E	I	E
KKII/3#2 (SEKANS KİMLİK NUMARASI:25)	P	A	N	H	L	E	E	S	G
KKII/3#3 (SEKANS KİMLİK NUMARASI:26)	H	A	N	H	Q	E	E	T	G
KKII/3#4 (SEKANS KİMLİK NUMARASI:27)	H	A	N	H	Q	E	Q	T	A
KKII/3#5 (SEKANS KİMLİK NUMARASI:28)	H	A	S	L	P	E	E	I	G
KKII/3#6 (SEKANS KİMLİK NUMARASI:29)	H	A	N	H	Q	E	E	S	G
KKII/3#7 (SEKANS KİMLİK NUMARASI:30)	H	A	N	H	Q	E	E	S	G
KKII/3#8 (SEKANS KİMLİK NUMARASI:31)	H	A	N	H	Q	E	E	S	G
KKII/3#9 (SEKANS KİMLİK NUMARASI:32)	H	A	N	H	Q	E	E	S	G
KKII/3#10 (SEKANS KİMLİK NUMARASI:33)	H	G	A	H	L	E	E	I	E
Konsensus	H	A	N	H	Q	E	E	S/T	G
(a) Renklendirilmiş kalıntılar amino asit numaraları LACI(K1) (LACI kalıntıları 50-107 (SEKANS KİMLİK NUMARASI:32)) 58 amino asit uzunluğunda olup, P1 pozisyonu, kalıntı numarası 15’tir ve bu durumda lizin gibi sabitlenmektedir.									

Burada açıklanan yöntemlerde ve bileşimlerde kullanılabilen polipeptitler, herhangi bir standart polipeptit sentez protokolün veya ekipmanı kullanarak sentetik şekile meydana getirilebilmektedir. Örneğin, burada açıklanan bir KI polipeptitinin adım adım sentezi, bir başlangıç (yani karboksi terminal) amino asidinden bir amino (N) terminal koruyucu grubun çıkarılması ve buraya, polipeptit sekansındaki sonraki amino asidin karboksil ucunun bağlanmasını sağlayarak gerçekleştirilebilmektedir. Bu amino asit ayrıca uygun şekilde korunmaktadır. Sonraki amino asidin karboksil grubu; hidroksibenzotriazol veya pentaflorofenil esterleri gibi bir "aktif ester" grubu veya bir karbodiimit veya bir simetrik asit anhidridi haline getirilme gibi bir reaktif grup haline getirilme yoluyla, bağlanmış amino asidin N-terminusu ile reaksiyona girmesi için aktif hale getirilebilmektedir. Tercih edilen katı faz polipeptit sentez yöntemleri, a-amino koruyucu grup olarak tert-bütoksikarbonilden faydalanan BOC yöntemini ve amino asit kalıntıları a-aminosunun korunması için 9-florenilmetiloksikarbonilden faydalanan Fmoc yöntemini kapsamaktadır. Her iki yöntem de teknikte uzman kişiler tarafından iyi bilinmektedir (Stewart, J. ve Young, J., Solid-Phase Peptide Synthesis (W. H. Freeman Co., San Francisco 1989); Merrifield, J., 1963. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154; Bodanszky, M. ve Bodanszky, A., The Practice of Peptide Synthesis (Springer-Verlag, New York 1984). Arzu edilmesi halinde, ilave amino- ve/veya karboksi-terminal amino asitleri, amino asit sekans halinde tasarlanabilmektedir ve polipeptit sentezi sırasında ilave edilebilmektedir.

Alternatif olarak, buluşun bileşimlerinde ve yöntemlerinde kullanılabilen Kunitz alan polipeptitleri ve KI polipeptitleri, bakteriyel ekspresyon vektörleri, maya ekspresyon vektörleri, bakteriyel ekspresyon vektörleri, memeli viral ekspresyon vektörleri ve benzeri dahil, ancak bunlarla sınırlanmamak üzere, çok sayıda hücre ve ilgili ekspresyon vektöründen herhangi biri kullanarak, rekombinant yöntemler yoluyla meydana getirilebilmektedir.

Buluşun bileşimlerinde yöntemlerinde kullanılabilen Kunitz alan polipeptitleri ve KI polipeptitleri, burada açıklanan bir Kunitz alan veya KI polipeptiti için bir kodlama sekansı içeren nükleik asit molekülleri kullanarak transjenik olarak da üretilebilmektedir, burada nükleik asit molekülü, teknikte mevcut olan transjenik yöntemler kullanarak bir konak hayvana ait genoma entegre edilebilmektedir veya bundan eksprese edilebilmektedir. Bazı durumlarda, bir konak hücresinde halihazırda eksprese edilen bir füzyon polipeptitinin meydana getirilmesi amacıyla, bir Kunitz alan polipeptidine yönelik kodlama sekansı veya Kunitz alan içeren bir KI polipeptitinin, bir ekspresyon vektöründeki bir başka kodlama sekansı ile füzyonlanması gerekli veya avantajlı olabilmektedir. Tercihen, bu tür bir füzyon polipeptitini eksprese eden konak hücre, ayrıca, buluşta kullanılabilen, yalnızca arzu edilen amino asit sekansı içeren bir Kunitz alan veya KI polipeptitinin elde edilmesi için füzyon polipeptitini

proses etmektedir. Açık bir şekilde, eksprese edilen Kunitz alanı veya KI polipeptidine herhangi bir amino asitin tutturulmuş olarak kalması durumunda, buluşun yöntemleri veya bileşimlerinde polipeptit kullanımı önüne geçilmesi için, bu ilave amino asitler, Kunitz alanı veya KI polipeptitinin kallikren bağlama ve/veya kallikrein inhibitör aktivitesini azaltmamalıdır.

Burada açıklanan yöntemlerde ve bileşimlere kullanılabilen KI polipeptitlerinin üretilmesine yönelik tercih edilen bir rekombinant ekspresyon sistemi bir maya ekspresyon vektörü olup, bir KI polipeptitinin veya Kunitz alanı polipeptitinin, *Saccharomyces cerevisiae*'nin meta prepro lider peptit sekansı kodlayan bir nükleotit sekansı ile aynı kuma çerçevesi içerisinde bağlanması için amino asit sekansı kodlayan bir nükleik asit sekansı mücade etmektedir, böylelikle uygulanabilir bir maya başlatıcısının kontrolü altındadır. Elde edilen rekombinant maya ekspresyon plazmidi, bunun ardından, uygun, uyumlu bir maya konağı hücrelerine standart yöntemler vasıtasıyla dönüştürülebilmekte olup, bu hücreler, rekombinant maya ekspresyon vektöründen rekombinant proteini eksprese edebilmektedir. Tercihen, bu tür bir rekombinant ekspresyon vektörü ile dönüştürülebilen bir konak maya hücresi, buluşun yöntemlerinde ve bileşimlerinde kullanılabilen bir aktif KI polipeptitinin sağlanması için füzyon proteinini proses edebilmektedir. Bu tür Kunitz alanları içeren rekombinant Kunitz alanı polipeptitlerinin ve KI polipeptitlerinin üretilmesine yönelik tercih edilen bir maya konağı *Pichia pastoris*'tir.

Yukarıda not edildiği üzere, burada açıklanan yöntemlerde ve bileşimlerde kullanılabilen KI polipeptitleri, burada açıklanan bir Kunitz alanı polipeptitini içerebilmektedir. Burada açıklanan yöntemlerde ve bileşimlerde kullanımı önüne geçmek amacıyla ilave amino asitlerin, kallikrein bağlama afinitesini veya kallikrein inhibisyon aktivitesini ciddi oranda azaltmamaları şartıyla, bazı KI polipeptitleri, amino ve/veya karboksi terminal ucunda, tercihen bir ila altı amino asit uzunluğunda olan bir ilave yandan destekleme sekansı sahip olabilmektedir. Bu tür ilave amino asitler, belirli bir rekombinant konak hücrede bir KI polipeptitinin ekspresyonu için kasten ilave edilebilmektedir veya bir ilave işlevin sağlanması amacıyla, örneğin KI polipeptitinin başka bir moleküle bağlanması için bir peptidin sağlanması amacıyla veya polipeptitin saflaştırılması kolaylaştırılan bir afinite kısmının sağlanması amacıyla ilave edilebilmektedir. Tercihen, ilave amino asitler, Kunitz alanının disülfür bağları müdahale edebilen sisteini kapsamamaktadır. Kunitz alanlarının natif örnekleri, disülfür bağları sergilemektedir, örneğin BPTI, amino asit kalıntıları 5 ve 55; 14 ve 38; ve 30 ve 51'deki sistein kalıntıları arasında bisülfür bağları içermektedir.

Buluşun yöntemlerinde ve bileşimlerinde kullanılabilen Kunitz alan polipeptiti, SEKANS KİMLİK NUMARASI:2'nin 3 ila 60 kalıntılarının amino asit sekansına sahiptir. Bir maya füzyon proteini ekspresyon sistemi içerisinde eksprese edildiğinde veya proses edildiğinde (örneğin entegrasyon ekspresyon plazmidi pHIL-D2'ye dayanarak), bu tür bir Kunitz alan polipeptiti, *S. cerevisiae*'nin mata prepro lider peptit sekansı ile füzyondan bir ilave amino terminal Glu-Ala dipeptidini tutmaktadır. Maya konak hücresinden salgılandığında, çoğu lider peptiti, SEKANS KİMLİK NUMARASI:2'nin amino asit sekansına (Şekil 2'deki kutulu bölgeye bakınız) sahip bir işlevsek KI polipeptitinin (ayrıca "PEP-1" veya "DX88" olarak adlandırılmaktadır) elde edilmesi için füzyon proteiniinden proses edilmektedir.

Özellikle, burada açıklanan yöntemlerde ve bileşimlerde kullanılabilen, tercih edilen KI polipeptitleri, aprotininkinden 1000 kat yüksek olan bir sirta üzerindeki kallikreine yönelik bir bağlama afinitesine sahiptir ki bu, kan kaybının azaltılması için CABG prosedürlerinde kullanılmakla birlikte onay almıştır. Burada açıklanan bu tür KI polipeptitlerinin şaşırtıcı derecede yüksek olan bağlama afiniteleri göstermektedir ki bu tür KI polipeptitleri, diğer moleküler hedeflerin dışarıda bırakılmasına yönelik kallikrein için yüksek bir spesifite seviyesi sergilemektedir (bakınız aşağıdaki Tablo 1). Dolayısıyla, buluşa göre bu tür polipeptitlerin kullanılması olası terapötik hedeflere yönelik spekülasyonların çoğunu azaltmaktadır. Örneğin aprotinin tarafından sergilenen düşük spesifite seviyesi, terapötik mekanizması bakımından muhtemel ve olası pleiotropik yan etkilere yol açmaktadır.

Örneğin SEKANS KİMLİK NUMARASI:1 tarafından tanımlanan polipeptitler, değişimsiz pozisyonlar içermektedir, örneğin 5, 14, 30, 51 ve 55 pozisyonları yalnızca Cys olabilmektedir. Örneğin 6, 7, 8, 9, 20, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 41, 42, 44, 46, 47, 48, 49, 50, 52, 53 ve 54 gibi diğer pozisyonlar amino asit olabilmektedir (doğal olmayan şekilde meydana gelen amino asitler dahil). Özellikle tercih edilen bir yapılandırılma, bir veya daha fazla amino asit, bir natif sekansına karşı gelmektedir (örneğin LACI (SEKANS KİMLİK NUMARALARI: 32 ila 34)). Tercih edilen bir yapılandırılma, en az bir değişken pozisyon natif sekansından farklıdır. Tercih edilen bir başka yapılandırılma, amino asitlerin her biri korumalı veya korumalı olmayan bir amino asit ikamesi tarafından bireysel olarak veya topluca ikame edilebilmektedir. Korumalı amino asit ikameleri, bir amino asiti, benzer kimyasal yapıya sahip bir başka amino asit ile değiştirebilmektedir ve protein işlevi üzerinde herhangi bir etkiye sahip olmayabilmektedir. Korumalı olmayan amino asit ikameleri, bir amino asiti, benzer olmayan kimyasal yapıya sahip bir başka amino asit ile değiştirmektedir. Korunmuş amino asit

ikamelerinin örnekleri, örneğin Asn->Asp, Arg->Lys ve Ser->Thr'yi içermektedir. Tercih edilen bir yapılandırılarda, bu amino asitlerden 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ve/veya 21'i, herhangi bir kombinasyonda, SEKANS KİMLİK NUMARASI:2'nin ilgili pozisyonuna karşılık gelmesi için bağlanarak veya toplu şekilde seçilebilmektedir.

Diğer pozisyonlar, örneğin 10, 11,13, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 31, 32, 34, 35, 39, 40, 43 ve 45 pozisyonlar seçilmiş amino asit kümesinden herhangi biri olabilmektedir. Dolayısıyla, SEKANS KİMLİK NUMARASI:1, bir dizi olasılık sekanslanmaktadır. Bu kümenin her bir üyesi, örneğin 5, 14, 30, 51 ve 55 pozisyonlardaki bir sisteini ve 10, 11, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 221, 22, 23, 31, 32, 34, 35, 39, 40,43 ve 45 pozisyonlardaki belirli bir amino asit kümesinden herhangi birini içermektedir. Tercih edilen bir yapılandırılarda, bu amino asitlerin 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15,16, 17, 18 ve/veya 19'u, herhangi bir kombinasyonda, SEKANS KİMLİK NUMARASI:2'nin ilgili pozistonuna karşılık gelmesi için bireysel oarak veya toplu şekilde seçilebilmektedir. Peptit tercihen, SEKANS KİMLİK NUMARASI:2 ile en az %80, en az %85, en az %90 veya en az %95 özdeşliğe sahiptir.

Yöntemler ve Bileşimler

Mevcut buluş, organlar veya dokular muhafaza edilmesine yönelik yöntemler ile ilgili olup, organ veya dokunun, istemlerde açıldığında üzere bir koruyucu çözelti ile temas ettirilmesini içermektedir. Buluş ayrıca, konağından çıkarılmış olan bir organ veya dokunun reperfüzyon hasarını veya zedelenmesinin azaltılmasını, inhibe edilmesi veya önlenmesi ile ilgili olup, organ veya dokunun söz konusu kallikrein inhibitörü ile temas ettirilmesini içermektedir. Buluşun koruyucu çözeltileri, söz konusu organlar ve dokular çözelti ile temas ettirildiğinde organ dokusunun veya organlar tamamını muhafaza edilmesi ve/veya korunması için kullanılabilmektedir. Buluşun spesifik bir yapılandırılmasında bir insan kalbinin veya bir insan miyokardiyal dokusunun muhafaza edilmesine yöneliktir. Buluşun bir başka yapılandırılmasında bir insan akciğerinin veya bir insan akciğer dokusunun muhafaza edilmesine yöneliktir. Buluşa göre muhafaza edilebilen diğer organlar veya bunların bölümleri böbrek, karaciğer, endotelial doku, intestinal doku, vasküler doku (örneğin bir anort grefti), deri ve pankreası kapsamaktadır. Buluş, memeli dokularını, organlarını veya bunların bölümlerinin muhafaza edilmesine yönelik çözeltilerden faydalanmaktadır. İlaveten, çözeltiler, örneğin nakil prosedürü sırasında organ veya dokunun perfüzyonu vasıtasıyla organların naklinin kolaylaştırılmasını için kullanılabilmektedir. Çözelti ayrıca kardiyak cerrahide bir kardiyopleji

çözültisi olarak da kullanılabilmektedir. Tercihen, organ veya bunun bir bölümü, özellikle nakil prosedüründen önce her zaman uygun bir çözelti içerisinde tutulmaktadır

- 5 Buluşun çözültileri, saklama, nakil veya diğer ameliyatlar sırasında organın yaşayabilirliğinin korunması için kullanılabilmektedir. Buluş, doku veya organların saklanmasıyla yönelik bir yöntem içermekte olup, söz konusu doku, organ veya bunun bir bölümünün, *in vivo* ve/veya *in vitro* yaşayabilirliğin uzatılacağı şekilde buluşun çözeltisi ile temas ettirilmesini içermektedir. Çözültiler, kalp veya akciğer dokusunun yaşayabilirliğinin 24 saat veya daha fazlasına kadar sürdürülmesine imkan tanımaktadır. Buluşun çözültilerinin kullanımı organ yaşayabilirliğinin
- 10 geliştirilmesi ile sonuçlanmaktadır

- Alternatif olarak veya ilaveten, donörden çıkarıldığında organ veya yaşayan doku, inhibitörü içeren bir muhafaza çözeltisi içerisine koyulabilmektedir. İlaveten, kallikrein inhibitörü ayrıca tercihen, nakilden hemen önce veya bununla birlikte organ alınırken uygulanmaktadır. Her
- 15 durumda, inhibitör ayrıca, dokuya enjeksiyon vasıtasıyla olduğu gibi risk altındaki dokuya doğrudan uygulanabilmektedir veya burada açıklanan ve/veya teknikte bilinen herhangi bir yöntem veya formülasyon kullanılarak, oral veya parenteral uygulama vasıtasıyla sistemik olarak sağlanabilmektedir.

- 20 Bir yapılandırılarda, piyasada mevcut herhangi bir muhafaza çözeltisinden faydalanılabilmektedir. Bu tür çözültilerin örnekleri, 4,798,824, 4,873,230, 4,879,283 numaralı U.S. Patent Dokümanlarında açıklanan, VIASPAN ticari markası altında satılan Belzer UW çözeltisini kapsamaktadır

- 25 Yukarıda bahsedilen patentlerde açıklanan muhafaza çözeltisi ve dışın süzüntüsü bileşimi, bunlarla sınırlanmamak üzere aşağıdakileri kapsamaktadır

TABLO 2

Madde	1 Litredeki miktar
K ⁺ - laktobiyonat	100 mmol
KH ₂ PO ₄	25 mmol
MgSO ₄	5 mmol
Rafinoz	30 mmol
Adenozin	5 mmol
Glutasyon	3 mmol
İnsülin	100 U

Baktrim	0.5 mL
Deksametazon	8 mg
Allupurinol	1 mM
Yaklaşık 200,000 ila yaklaşık 300,000 daltonluk bir moleküler ağırlığa ve yaklaşık 0.4 ila 0.7'lik bir ikame derecesine sahip hidroksietil nişasta	50 g

Çözelti, oda sıcaklığında NaOH ile pH 7.4'ye getirilmektedir. Nihai konsantrasyonlar $Na=30. \pm 5$ mM, $K^+ = 120 \pm 5$ mM, mOsm/litre= 320 ± 5 'tir. Baktrim = trimetoprim (16 mg/mL) ve sülfametoksazol (80 mg/mL). Hidroksietil nişasta, yaklaşık %3 ila yaklaşık 8 aralığında mevcut olabilmektedir.

Bu çözelti tipik olarak, pankreasın 72 saat muhafaza edilmesini, böbreğin 48 saat muhafaza edilmesini ve karaciğerin en az 24 saat muhafaza edilmesini sağlamaktadır. 5,145,771 numaralı U.S. Patent Dokümanı ayrıca mevcut buluşta da kullanılabilen, "Carolina Çözeltisi" olarak bilinen organ muhafaza yöntemini açıklamaktadır. Yukarıda bahsi geçen patentte açıklanan durulama veya muhafaza çözelti bileşimi, bunlarla sınırlanmamak üzere, aşağıdaki Tablo 3'te ortaya koyulan konsantrasyon aralıklarındaki bileşenleri içermektedir.

TABLO 3

1 Litredeki Konsantrasyon Aralıkları %10 modifiye hidroksietil nişasta 30 g/L ila 100 g/L			
NaCl	85 mM	ila	145 mM
KCl	3 mM	ila	6 mM
CaCl ₂	1.0 mM	ila	1.6 mM
KH ₂ PO ₄	0.7 mM	ila	1.3 mM
MgSO ₄	0.9 mM	ila	1.5 mM
Allopurinol	0.05 mM	ila	5.0 mM
Desferrioksamin	0.02 mM	ila	2.0 mM
Glutasyon	0.5 mM	ila	10.0 mM
Nikardipen	0.1 .mu.M	ila	5.0 .mu.M
Adenozin	0.1 mM	ila	5.0 mM
Fruktoz	1.0 mM	ila	50.0 mM
Glukoz	1.0 mM	ila	50.0 mM
İnsülin	5 U/L	ila	250 U/L
Moplar	2 mM		40 mM

Spesifik bir yapılandırma, aşağıda ortaya koyulan talimatlara göre aşağıdaki Tablo 4'te ortaya koyulan miktarlardaki bileşenler ile hazırlanmaktadır.

TABLO 4: 1 Litre Durulama Çözeltisinin Bileşenleri

500 mL	Damıtılmış Deiyonize Edilmiş Su	
50 g/L	%10 modifiye hidroksietil nişasta	
115 mM	NaCl	6.7 g
5 mM	KCl	0.37 g
1.30 mM	CaCl ₂	0.19 g
1 mM	KH ₂ PO ₄	0.14 g
1.2 mM	MgSO ₄	0.15 g
1 mM	Allopurinol	0.14 g
1 mM	Desferrioksamin	0.65 g
3 mM	Glutatyon	0.92 g
2 .mu.M	Nikardipen	0.80 mg
1 mM	Adenozin	0.32 g
10 mM	Fruktoz	1.8 g
10 mM	Glukoz	1.8 g
100 U/L	İnsülin	100 birim
20 mM	Moplar	4.2 g

Bir yapılandırma bu çözelti şu şekilde hazırlanabilmektedir: 500 mL'lik bir volümetrik cam kap kullanılarak, %10 (ağırlık/hacim) hidroksietil nişastanın 500 mL'sini ölçün ve 1 L'lik bir beher içerisine dökün. Çift damıtılmış suyun 400 mL'sini ilave edin ve bir manyetik karıştırma çubuğu kullanarak kuvvetlice karıştırın. Bileşenlerin geri kalanını tek tek ilave edin. Tüm bileşenler ilave edildikten sonra, 1-2 mL 5N NaOH ile pH'ı 6.5'e ayarlayın. Çözelti en az otuz dakika boyunca karıştırılmalıdır. Çözeltiyi 1 L'lik bir volümetrik cam kap içerisine aktarın ve 1 L'lik nihai hacme getirin. Çözünmemiş partikülleri gidermek için filtreleyin.

10 Bir başka yapılandırma ise aşağıdaki Tablo 5'te örneklendirilmektedir.

TABLO 5: 1 Litredeki Konsantrasyon Aralıkları

NaCl	85 mM	ila	145 mM
KCl	3 mM	ila	6 mM
CaCl ₂	1.0 mM	ila	1.6 mM
KH ₂ PO ₄	0.7 mM	ila	1.3 mM
MgSO ₄	0.9 mM	ila	1.5 mM
Adenozin	0.12 mM	ila	1.2 mM

Yukarıdaki Tablo 5'e göre bir bileşim, yukarıdaki Tablo 3'te belirtilen diğer içerik maddelerinin birini, birkaçını veya tamamını tercihe bağlı olarak içerebilmektedir. Tercihen bileşim en az bir antioksidan içermektedir. Dolayısıyla, bir bileşimin bir spesifik yapılandırması aşağıdaki Tablo

15

6'da öne sürülmektedir:

TABLO 6: 1 Litre Durulama Çözeltisinin Bileşenleri

500 mL	Damıtılmış Deiyonize Edilmiş Su	
115 mM	NaCl	6.7 g
5 mM	KCl	0.37 g
1.30 mM	CaCl ₂	0.19 g
1 mM	KH ₂ PO ₄	0.14 g
1.2 mM	MgSO ₄	0.15 g
1 mM	Allopurinol	0.14 g
1 mM	Desferrioksamin	0.65 g
3 mM	Glutasyon	0.92 g
.12 mM	Adenozin	0.038g

Tercih edilen bileşimler ayrıca, bir veya daha fazla farmasötik olarak kabul edilebilir
5 tamponlar, tşayıcılar, antioksidanlar, proteaz inhibitörleri veya diğer anti-iskemi ajanlar içerebilmektedir.

Buluşun yöntemlerinde ve bileşimlerinde kullanılabilen bileşimler, SEKANS KİMLİK
NUMARASI:2'nin 3 ila 60 amino asitinin bir 58-amino asit sekansına sahip bir Kunitz alanı
10 polipeptiti içeren KI polipeptitlerini içermektedir. Buluşun yöntemlerinde ve bileşimlerinde
kullanılabilen, özellikle tercih edilen bir KI polipeptitinin bir örneği, SEKANS KİMLİK
NUMARASI:2'nin 60-amino asit sekansına sahip PEP-1 KI polipeptitidir. SEKANS KİMLİK
NUMARASI:2'nin amino asit sekansı kodlayan bir nükleotit sekansı SEKANS KİMLİK
NUMARASI:3'te sağlanmaktadır (bakınız Şekil 2'deki nükleotitler 309-488). Bilinen genetik
15 koda dayanarak, buluşun ayrıca, nükleotit sekansı tarafından kodlanan her bir amino asit için
bilinen dejenere kodonları bir veya daha fazlasının ikame edilmesi vasıtasıyla SEKANS KİMLİK
NUMARASI:3'ün nükleotit sekansı dejenere formları sağladığı anlaşılmaktadır SEKANS
KİMLİK NUMARASI:3'ün nükleotitleri 7-180 veya bunun dejenere formları SEKANS KİMLİK
NUMARASI:2'nin 3-60 amino asitlerinin 58-amino asit sekansına sahip, doğal olmayan şekilde
20 meydana gelen Kunitz alanı polipeptitini kodlamaktadır

KI polipeptitlerine Yönelik Konsantrasyon Hususları

Buluşun yöntemlerinde bir KI polipeptiti ile dozlama ile ilgili birkaç husus, SEKANS KİMLİK
25 NUMARASI:2'nin amino asit sekansına sahip buluşun temsili PEP-1 KI polipeptiti ile örnek
olarak gösterilebilmektedir (moleküler ağırlık 7,054 Dalton).

Aşağıdaki Tablo 7, kallikreine yönelik PEP-1 KI polipeptitinin afinitesi ($K_{i,app}$) ve bilinen on bir diğer plazma proteazın bir karşılaştırılması bulunmaktadır.

TABLO 7

Proteaz Substratı	PEP-1 $K_{i,app}$ (pM)	Aprotinin $K_{i,app}$ (pM)
insan plazma kallikreini	44	3.0×10^4
insan idrar kallikreini	$>1 \times 10^8$	4.0×10^3
domuz pankreatik kallikrein	2.7×10^7	550
insan C1r, aktif	$>2.0 \times 10^8$	1.0×10^7
insan C1s, aktif	$>2.0 \times 10^7$	$>1.0 \times 10^8$
insan plazma faktörü XIa	1.0×10^4	ND
insan plazma faktörü XIIa	$>2.0 \times 10^7$	$>1.0 \times 10^8$
insan plazmini	1.4×10^5	894
insan pankreatik tripsin	$>2 \times 10^7$	ND
insan pankreatik kimotripsin	$>2.0 \times 10^7$	7.3×10^5
insan nötrofil elastazı	$>2.0 \times 10^7$	1.7×10^6
insan plazma trombini	$>2.0 \times 10^7$	$>1.0 \times 10^8$
ND = belirlenmemiş		

5

Açık şekilde, PEP-1 KI polipeptiti, insan plazma kallikreini için fazlaca spesifiktir. Dahası kallikreine yönelik PEP-1 afinitesi ($K_{i,app}$), kallikrein yaklaşık 44 pM olduğundan dolayı PEP-1'in kallikrein: $K_{i,app}$ 'sine yönelik aprotinin afinitesinden 1000 kat daha yüksek iken, kallikreine yönelik aprotininin $K_{i,app}$ 'si 30,000 pM'dir. Dolayısıyla, PEP-1'in bir dozu, mol başına, aprotinin için kullanıldandan yaklaşık olarak 1000 kat daha düşük olabilmektedir. Ancak, diğer birkaç faktöre yönelik husular, pratikte gereken PEP-1'in dozunun daha doğru bir şekilde tahmin edilmesini sağlamaktadır. Bu tür faktörler, belirli bir hastadan organı çıkarılma üzerinde aktif hale gelen kallikrein miktarını kapsamaktadır ve teknikte uzman bir kişi tarafından anlaşılacaktır.

15

Buluş ayrıca aşağıdaki sınırlanmamış örneklerle referansla açıklanacaktır.

ÖRNEKLENDİRME

20 Örnek 1: Bir temsili KI, polipeptit.

Buluşun bileşimlerinde ve yöntemlerinde kullanılabilecek bir KI polipeptiti (PEP-1), bir faj

görüntüleme kütüphanesinden bir rekombinant faj üzerinde görüntülenen bir kallkrein bağlama polipeptiti olarak tanımlanmıştır. PEP-1, şu amino asit sekansına sahiptir: Glu Ala Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEKANS KİMLİK NUMARASI:2). PEP-1'in moleküler ağırlığı 17,054 Dalton'dur.

PEP-1 amino asit sekansı (SEKANS KİMLİK NUMARASI:2'nin 3-60 amino asitleri) kodlayan rekombinant faj DNA'nın nükleotit sekansı (SEKANS KİMLİK NUMARASI:3), rekombinant faj DNA'dan belirlenen standart yöntemler vasıtasıyla izole edilmiştir ve sekanslanmıştır. PEP-1, *Pichia pastoris* maya suşunun *His4* fenotip konak hücrelerindeki bir rekombinant protein olarak ilave karakterizasyonu için kullanılabilen miktarlarda üretilmiştir.

Örnek 2: KI polipeptitlerinin eksprese edilmesi için bir rekombinant plazmitin meydana getirilmesi.

Başlangıçtaki plazmid, pHIL-D2, ampicilin rezistant ve *P. pastoris*'ten *His4*ün bir yaban tipi alelini içermektedir. Rekombinant ekspresyon plazmidi pPIC-K503 içerisinde mata Prepro-PEP-1 füzyon proteini için kodlama sekansı içeren nihai DNA sekansı Şekil 2'de gösterilmektedir. PHIL-D2'nin DNA sekansı aşağıdaki gibi, pPIC-K503'ün üretilmesi için modifiye edilmiştir:

1. *His4* geninin akış aşağısında konumlandırılan, pHIL-D2'nin 3' AOX1 bölgesindeki *Bst*BI alan kısmi restriksiyon sindirimi, doldurma ve ligasyon vasıtasıyla giderilmiştir, böylelikle TTCGAA (SEKANS KİMLİK NUMARASI:23) ile TTCGCGAA (SEKANS KİMLİK NUMARASI:24) arasında sekans değiştirilmiştir. Bu modifikasyon, ekspresyon kasetinin plazmit halinde klonlanmasını kolaylaştırması ve yönlendirilmesi için gerçekleştirilmiştir.

2. *His4*ün akış aşağısında konumlandırılan *bla* genini taşıyan *Aat*II alanı restriksiyon sindirimi, doldurma ve ligasyon vasıtasıyla giderilmiştir, böylelikle GACGTC (SEKANS KİMLİK NUMARASI:25) ile GACGTACGTC (SEKANS KİMLİK NUMARASI:26) arasında sekans modifiye edilmiştir. Bu modifikasyon, *Aat*II alanlarına sahip ekspresyon kasetlerinin plazmidler halinde klonlanmasını kolaylaştırması için gerçekleştirilmiştir. PEP-1'i kodlayan DNA, orijinal kallikrein-bağlama görüntüleme fajına ait nükleotit sekansına dayanarak sentezlenmiştir ve 450 baz çiftinden (bp) oluşmuştur. PHIL-D2 plazmidi içerisindeki eklentisinin nihai DNA sekansı bir 5' AOX1 sekansı ve bir 3' AOX1 sekansı tarafından desteklenmektedir (bunun kısımları Şekil 2'de gösterilmektedir) ve PEP-1 KI

polipeptiti için yapısal kodlama sekansına füzyonlanan *S. cerevisiae*'nin meta prepro sinyal peptidini içeren bir füzyon proteinini kodlamaktadır. Sinyal peptidi, maya konak hücrelerinden PEP-1'in salgılanmasını kolaylaştırmak için ilave edilmiştir. Eklentinin oluşturulmasına yönelik oligonükleotitler sentezlenmiştir ve ticari olarak elde edilmiştir (Genesis Labs, The Woodlands, TX) ve eklenti, polimeraz zinciri reaksiyonu (PCR) vasıtasıyla meydana getirilmiştir. Mat prepro/PEP-1 füzyon proteinini kodlayan bağlanmış sentetik DNA, bunun ardından, *Bst*BI ve *Eco*RI alanları arasındaki modifiye PHIL-D2 plazmidinin içerisinde ligasyon vasıtasıyla dahil edilmiştir.

Ligasyon ürünleri, *Escherichia coli* suşu XL1 Mavi'nin dönüştürülmesi için kullanılmıştır. Bir PCR tahlili, arzu edilen plazmid yapıları için *E. coli* transformantlarının taranması için kullanılmıştır. Hücre özütlerinden DNA, 5' AOX1 ve 3' AOX1 sekansları içeren primerler kullanılarak PCR vasıtasıyla yükseltilmiştir (yukarı ve Şekil 2'ye bakınız). Doğru baz çiftleri sayılarak PCR ürünleri sekanslanmıştır. İlaveten, klonlama alanları her iki tarafındaki yaklaşık olarak 20 ila 50 bp sekanslanmıştır ve tahmini sekans elde edilmiştir. PHIL-D2 plazmidindeki eklentinin nihai DNA sekansı (plazmid pPIC-K503 elde etmek için), PEP-1 KI polipeptiti için yapısal kodlama sekansına füzyonlanan *S. cerevisiae*'nin meta prepro sinyal peptidini içeren füzyon proteininin ilgili amino asit sekansı ve yandan destekleyen 5' ve 3' AOX1 sekansları ile birlikte Şekil 2'de gösterilmektedir. Arzu edilen ekspresyon plazmid yapıları, plazmid pPIC-K503, sahip bir transformant, PEP-1'in rutin üretimi için maya hücre hatları hazırlanması amacıyla seçilmiştir.

Örnek 3: Rekombinant maya hücre hattından PEP-1'in imal edilmesi

His4 fenotipine sahip *P. pastoris* GS115'in sferoplastları *SacI* alanında plazmidin lineerleştirilmesinden ve plazmid DNA'nın konak 5' AOX1 yerine homolog rekombinasyonundan sonra ekspresyon plazmidini pPIC-K503 (yukarıda) ile dönüştürülmüştür. Üretim suşunun fenotipi *His4*⁺'tür. Plazmitin tamamı mayanın 5' AOX1 genomik sekansına içisine eklenmiştir.

Dönüştürmeye ait izolatlar, tek karbon kaynağı olarak metanol ile dısal histidinin yokluğundaki büyüme için taranmıştır. Transformantların %95'inden fazlası tek karbon kaynağı olarak metanol ile büyümenin yaban tipi yetisini korumuştur, böylelikle plazmidin, trans yer değişiminden ziyade homolog rekombinasyon vasıtasıyla konak genomuna eklendiğini göstermiştir. Bu transformantlar, büyüme için dısal histidin gerektirmemiştir,

böylelikle plazmidin, konak genomuna entegre olduğunu göstermiştir. Seçilmiş koloniler klonlanmıştır. Küçük kültür ekspresyonu çalışmalarında kültür ortamı içerisinde aktif PEP-1'in en yüksek seviyelerini salgılayan kolların belirlenmesi için gerçekleştirilmiştir. Artık kültür süpernatant çözeltilerindeki PEP-1 salgıma seviyeleri, sodyum dodesil sülfat poliaktilamit gel elektroforezi (SDS-PAGE) vasıtasıyla PEP-1 seviyeleri için nicelleştirilmiştir ve kallikrein inhibisyonu için değerlendirilmiştir. Numunesi alınan kültürler arasında PEP-1 ekspresyonunun en yüksek seviyesine dayanarak PEP-1 üretimi için bir maya klonu seçilmiştir.

PEP-1'i üreten *P. pastoris*'in master ve çalışan hücre bankaları ticari olarak hazırlanmıştır (MDS Pharma Services, Bothell, Washington). Maya içerisinde PEP-1'in standart bir üretimi, aşağıdaki üç adıma içermiştir: (1) tohumlama kültürünün preparasyonu, (2) fermentasyon ve (3) kültürün geri kazanımı.

Tohumlama kültürü adımları PEP-1 üreten *P. pastoris*'in bir çalışan hücre bankasından tek bir viyalindeki içerik maddeleri ile, setil aşımaddesi sıvılaşmaya nitrojen bazlı potasyum fosfat ve gliserol, pH = 5) içeren altı cam kabın (her biri 300 mL) aşılmasından oluşmuştur. Cam kaplar, 30°C ± 2°C'de yaklaşık olarak 13 saat boyunca bir orbital çalkalayıcı (300 rpm) içerisine aşılanmıştır.

Fermentasyonlar, steril sıvı ile doldurulmuş bir kapalı 100 litrelik Braun fermentörü içerisinde gerçekleştirilmiştir. Her bir fermentasyon, altı tohum kültürü kabından içerik maddelerinin fermentörün içerisine aktarılmasıyla başlatılmıştır. Yaklaşık olarak 24 saat sonra, fermentör içerisindeki gliserol tükenmiştir ve ilave gliserol yaklaşık olarak 8 ilave saat boyunca ilave edilmiştir.

Yaklaşık olarak 83 saat sürmüş olan bir karışık besleme fazının ardından, bir gliserol ve emtanol beslemesinin ilave edilmesiyle başlatılmıştır. Bunun sonucunda fermentasyon sonlandırılmıştır ve fermentör içerikleri saflaştırılmış su ile seyreltilmiştir. PEP-1'in saflaştırılması ve proses edilmesi şu beş adımdan oluşmuştur: (1) genişletilmiş yatak kromatografisi, (2) katyon değişim kromatografisi, (3) hidrofobik etkileşim kromatografisi (HIC), (4) ultrafiltrasyon ve diafiltrasyon ve (5) nihai filtrasyon ve paketlenme.

Başlangıçtaki saflaştırma adımı genişletilmiş yatak kromatografisinden oluşmuştur. Seyreltilmiş fermentör kültürü, Streamline SP reçinesi ile paketlenmiş dengeli kolona uygulanmıştır (Amersham Pharmacia Streamline 200 kromatografi kolonu, Amersham Pharmacia,

Piscataway, New Jersey). Ardından kolon, genişletilmiş yataktan maya hücrelerinin durulanması için bir yukarı akış modunda yıkanmıştır (50 mM asetik asit pH = 3.0 - 3.5). Üst adaptör, genişletilmiş yatak üzerine yükseltilerek, yıkama artırılmıştır. Akış durdurulmuştur ve yatağı sabitlemesine izin verilmiştir. Adaptör sabitlenmiş yatağı biraz üzerinde olması için aşağı taşınmıştır. Akışın yönü değiştirilmiştir. Atık madde toplanmıştır. PH 4.0 OLAN 50 mM sodyum asetat kullanılarak aşağı doğru olan bir modda sürdürülmüştür. Atık madde toplanmıştır. PEP-1, pH 6.0'daki 50 mM sodyum asetat kullanılarak kolondan ayrılmıştır. Eluat, 50 litrelik bir kap içerisine toplanmıştır. Ardından, 0.22 m'lik bir filtreden geçirilerek, saflaştırma alanında konumlandırılan temiz bir kaba filtrelenmiştir. İlave numuneler, PEP-1 konsantrasyonunun belirlenmesi için toplanmıştır. Ardından, genişletilmiş yatak kolonundan filtrelenmiş eluat kullanılarak bir katyon değişim kromatografisi adımları gerçekleştirilmiştir. PEP-1, pH 6.2'deki 15 mM trisodyum sitrat kullanılarak kolondan ayrılmıştır.

İlave proteinler, hidrofobik etkileşim kromatografisi (HIC) vasıtasıyla PEP-1 preparasyonundan giderilmiştir. HIC'den önce, katyon değişim kolonundan eluat amonyum sülfat ile seyreltilmiştir. Eluat kolona uygulanmıştır ve PEP-1, potasyum fosfat (100 mM), pH 7.0 içerisinde amonyum sülfat (0.572 M) kullanılarak ayrılmıştır. Eluat, A280 değerlerine dayanarak fraksiyonları içerisinde toplanmıştır. Tüm fraksiyonlar, steril, önceden tartılmış PETG şişelerinin içerisinde toplanmıştır.

Seçilmiş fraksiyonlar, temiz bir kap içerisinde havuzlanmıştır. Havuz ultrafiltrasyon vasıtasıyla konsantre edilmiştir. Konsantre edilmiş PEP-1 preparasyonu, pH 7.0 olan on hacim değerindeki PBS'ye karşı hemen diafiltrelenmiştir.

Nihai bir filtrasyon adımları PEP-1 yığınının biyo-yükün minimize edilmesi için paketlenmeden önce gerçekleştirilmiştir. Yığın çözeltisi, 0.22 m değerindeki bir filtreden geçirilmiştir ve steril, önceden tartılmış bir PETG şişesinin içerisine toplanmıştır. Lot salın testi için bir numune çıkarılmıştır. Yığın geriye kalan, steril PETG şişelerinin içerisinde aseptik olarak dağıtılmıştır ve -20°C'de saklanmıştır.

Örnek 4: Kallikrein İnhibisyon Tahlili.

PEP-1 gibi KI polipeptitlerinin inhibitör aktivitesinin ölçülmesi için bir kinetik testi kullanılmıştır. Bir substrat, proliifenilalaninil amino metil kumarin, kallikrein aracılığıyla bölünmesinin ardından kinetik tahlil floresan ölçmektedir. Kallikreinin bilinen bir miktar bir

mikrotitreli plaka üzerinde uygun bir reaksiyon tamponu içerisinde, seri halde seyreltilmiş KI polipeptit referans standardı veya seri halde seyreltilmiş KI polipeptit test numuneleri ile inkübe edilmiştir. Her bir numune üç kopya halinde sürüldürülmüştür. Substray çözeltisi ilave edilmiştir ve plaka, 360 nm'lik bir eksitasyon dalga boyu ve 460 nm'lik bir emisyon dalga boyu kullanılarak hemen okunmuştur. Referans standardı ve numune eğrilerinden en az ikisi, geçerli sayılan 0.95'lik bir R-kare değerine sahip olunması için gerekli olmuştur.

Örnek 5: Organ Muhafazası

Konfluans HUVEC PBS içerisinde yıkandı ve serumsuz bir ortam (SFM) içerisinde 24 ila 48 saat boyunca 4 derecede inkübe edilmiştir. Soğukta saklanmalarından ardından, hücreler PBS ile birkaç kez yıkandı ve kallikrein (0.125 U) ve spesifik kallikrein substratı S2302 bu hücrelere ilave edilmiştir. Optik yoğunluktaki değişimler kaydedilmiştir. Soğukta depolamadan ardından hücreye bağlı PEP-1'in ışık mikroskobu değerlendirmesi için HUVEC, PEP-1, sabitlenmiş ve tavşan anti-PEP-1 ile işleme alındı formalin ve peroksidaz konjuge anti-tavşan IgG ile işleme alındı HUVEC'in kallikrein üretme yetisi, hücre yüzeyi üzerinde ve 37°C'de tutulan süpernatantları içerisinde değerlendirilmiştir. Kallikrein aktivitesi, 37°C'de tutulan süpernatantları içerisinde 380 ± 19 A.U. idi; aynı hücrelerin yüzeyinde hiçbir aktivite ölçülemedi. Buradaki bir ışık mikroskopisi değerlendirmesi, 24 saat boyunca soğukta işlenen HUVEC'in yüzeyine PEP-1'in bağlanmasıyla bağlanma maksimumu PEP-1 (5 mg/ml) varlığında hücrelerin inkübe edilmesiyle elde edilmiştir. Hücreye bağlı PEP-1, döl kallikreini inhibe etme yetisini korumuştur. Bu sonuçlar, PEP-1'in endotelial hücrelere bağlanarak, kallikrein inhibitör aktivitesini koruduğunu göstermektedir. Dolayısıyla, vasküler yüzey üzerindeki kinin aracılı hasarın belirlenmesi ve modüle edilmesi için kullanılabilmektedir.

Bu buluş, buluşun tercih edilen yapıları ve yöntemleri referansla gösterilmesine ve açıklanmasına rağmen, ekli istemler tarafından kapsanan buluşun kapsamından ayrılmaksızın biçim ve ayrıntılara yönelik çeşitli değişikliklerin yapılabileceği teknikte uzman kişiler tarafından anlaşılacaktır.

Bu buluşun diğer yönleri aşağıda açıklanmaktadır ve yapıları E1 ila E91 olarak adlandırılmaktadır; burada mevcut buluşun istemler tarafından tanımlandığı göz önünde bulundurulmalıdır.

E1. Bir organ veya dokunun muhafaza edilmesine yönelik bir yöntem olup, oran veya

dokunun, kallikrein inhibitörünün etkili bir miktarla temas ettirilmesini içermektedir.

E2. E1'e göre yöntem olup, burada polipeptit, bir Kunitz alanı içermektedir.

5 E3. E2'ye göre yöntem olup, burada kallikrein inhibitörü, SEKANS KİMLİK NUMARASI:2 içeren bir polipeptittir.

E4. E2'ye göre yöntem olup, burada kallikrein inhibitörü, SEKANS KİMLİK NUMARASI:2'nin 3 ila 60 amino asitlerini içeren bir polipeptittir.

10

E5. E1'e göre yöntem olup, burada organ veya doku kalp, akciğer, böbrek, pankreas, karaciğer, bağırsak, endotelyal doku, vasküler doku veya deridir.

E6. Xaa1 Xaa2 Xaa3 Xaa4 Cys Xaa6 Xaa7 Xaa8 Xaa9 Xaa10 Xaa11 Gly Xaa13 Cys Xaa15
15 Xaa16 Xaa17 Xaa18 Xaa19 Xaa20 Xaa21 Xaa22 Xaa23 Xaa24 Xaa25 Xaa26 Xaa27
Xaa28 Xaa29 Cys Xaa31 Xaa32 Phe Xaa34 Xaa35 Gly Gly Cys Xaa39 Xaa40 Xaa41
Xaa42 Xaa43 Xaa44 Xaa45 Xaa46 Xaa47 Xaa48 Xaa49 Xaa50 Cys Xaa52 Xaa53 Xaa54
Cys Xaa56 Xaa57 Xaa58 (SEKANS KİMLİK NUMARASI:1), burada

20

Xaa1, Xaa2, Xaa3, Xaa4, Xaa56, Xaa57 veya Xaa58'den her biri bireysel olarak bir amino asittir veya mevcut değildir;

Xaa6, Xaa7, Xaa8, Xaa9, Xaa20, Xaa24, Xaa25, Xaa26, Xaa27, Xaa28, Xaa29, Xaa41, Xaa42, Xaa44, Xaa46, Xaa47, Xaa48, Xaa49, Xaa50, Xaa52, Xaa53 ve Xaa54 herhangi bir amino asit olabilmektedir;

Xaa10 ise şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Asp ve Glu;

25

Xaa11 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Asp, Gly, Ser, Val, Asn, Ile, Ala ve Thr;

Xaa13 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Arg, His, Pro, Asn, Ser, Thr, Ala, Gly, Lys ve Gln;

30

Xaa15 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Arg, Lys, Ala, Ser, Gly, Met, Asn ve Gln;

Xaa16 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Ala, Gly, Ser, Asp ve Asn;

Xaa17 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Ala, Asn, Ser, Ile, Gly, Val, Gln ve Thr;

Xaa18 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: His, Leu, Gln ve Ala;

35

Xaa19 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Pro, Gln, Leu, Asn ve Ile;

Xaa21 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Trp, Phe, Tyr, His ve Ile;
Xaa22 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Tyr ve Phe;
Xaa23 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Tyr ve Phe;
Xaa31 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Ala,
5 Val, Leu, Ile ve Thr;
Xaa32 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Glu, Gln, Asp Asn, Pro, Thr,
Leu, Ser, Ala, Gly ve Val;
Xaa34 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Thr, Ile, Ser, Val, Ala, Asn,
Gly ve Leu;
10 Xaa35 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Tyr, Trp ve Phe;
Xaa39 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Glu, Gly, Ala, Ser ve Asp;
Xaa40 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Gly ve Ala;
Xaa43 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Asn ve Gly;
Xaa45 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Phe ve Tyr; ve
15 burada söz konusu poliopeptit, kallikreini inhibe etmektedir.

- E7. E6'ya göre yöntem olup, burada Xaa6 Ala'dır
- E8. E6'ya göre yöntem olup, burada Xaa7 Phe'dir.
20
- E9. E6'ya göre yöntem olup, burada Xaa8 Lys'dir.
- E10. E6'ya göre yöntem olup, burada Xaa9 Ala'dır
- E11. E6'ya göre yöntem olup, burada Xaa10 Asp'dir.
25
- E12. E6'ya göre yöntem olup, burada Xaa11 Asp'dir.
- E13. E6'ya göre yöntem olup, burada Xaa13 Pro'dur, Xaa15 Arg'dir, Xaa16 Ala'dır Xaa17
30 Ala'dır Xaa18 Hs'tir ve Xaa19 ise Pro'dur.
- E14. E6'ya göre yöntem olup, burada Xaa20 Arg'dir.
- E15. E6'ya göre yöntem olup, burada Xaa24 Asn'dir.
35

- E16. E6'ya göre yöntem olup, burada Xaa25 lie'dir.
- E17. E6'ya göre yöntem olup, burada Xaa26 Phe'dir.
- 5 E18. E6'ya göre yöntem olup, burada Xaa27 Thr'dir.
- E19. E6'ya göre yöntem olup, burada Xaa28 Arg'dir.
- E20. E6'ya göre yöntem olup, burada Xaa29 Gln'dir.
- 10 E21. E6'ya göre yöntem olup, burada Xaa31 Glu'dur.
- E22. E6'ya göre yöntem olup, burada Xaa32 Glu'dur.
- 15 E23. E6'ya göre yöntem olup, burada Xaa34 le'dir.
- E24. E6'ya göre yöntem olup, burada Xaa35 Tyr'dir.
- E25. E6'ya göre yöntem olup, burada Xaa39 Glu'dur.
- 20 E26. E6'ya göre yöntem olup, burada Xaa41 Asn'dir.
- E27. E6'ya göre yöntem olup, burada Xaa42 Arg'dir.
- 25 E28. E6'ya göre yöntem olup, burada Xaa44 Arg'dir.
- E29. E6'ya göre yöntem olup, burada Xaa46 Glu'dur.
- E30. E6'ya göre yöntem olup, burada Xaa47 Ser'dir.
- 30 E31. E6'ya göre yöntem olup, burada Xaa48 Leu'dur.
- E32. E6'ya göre yöntem olup, burada Xaa49 Glu'dur.
- 35 E33. E6'ya göre yöntem olup, burada Xaa50 Glu'dur.

- 5 E34. E6'ya göre yöntem olup, burada polipeptit şunlardan oluşan gruptan seçilen iki veya daha fazla amino asit içermektedir: Asp, Xaa10'da; Asp, Xaa11'de; Pro, Xaa13'te; Arg, Xaa15'te; Ala, Xaa16'da; Ala, Xaa17'de; His, Xaa18'de; Pro, Xaa19'da; Trp, Xaa21'de; Phe, Xaa22'de; Phe, Xaa23'te; Glu, Xaa31'de; Glu, Xaa32'de; Ile, Xaa34'te; Tyr, Xaa35'te; Glu, Xaa39'da; Gly, Xaa40'ta; Asn, Xaa43'te; ve Phe, Xaa45'te.
- 10 E35. E6'ya göre yöntem olup, burada polipeptit şunlardan oluşan gruptan seçilen beş veya daha fazla amino asit içermektedir: Asp, Xaa10'da; Asp, Xaa11'de; Pro, Xaa13'te; Arg, Xaa15'te; Ala, Xaa16'da; Ala, Xaa17'de; His, Xaa18'de; Pro, Xaa19'da; Trp, Xaa21'de; Phe, Xaa22'de; Phe, Xaa23'te; Glu, Xaa31'de; Glu, Xaa32'de; Ile, Xaa34'te; Tyr, Xaa35'te; Glu, Xaa39'da; Gly, Xaa40'ta; Asn, Xaa43'te; ve Phe, Xaa45'te.
- 15 E36. E6'ya göre yöntem olup, burada polipeptit şunlardan oluşan gruptan seçilen on veya daha fazla amino asit içermektedir: Asp, Xaa10'da; Asp, Xaa11'de; Pro, Xaa13'te; Arg, Xaa15'te; Ala, Xaa16'da; Ala, Xaa17'de; His, Xaa18'de; Pro, Xaa19'da; Trp, Xaa21'de; Phe, Xaa22'de; Phe, Xaa23'te; Glu, Xaa31'de; Glu, Xaa32'de; Ile, Xaa34'te; Tyr, Xaa35'te; Glu, Xaa39'da; Gly, Xaa40'ta; Asn, Xaa43'te; ve Phe, Xaa45'te.
- 20 E37. E6'ya göre yöntem olup, burada polipeptit şunlardan oluşan gruptan seçilen on beş veya daha fazla amino asit içermektedir: Asp, Xaa10'da; Asp, Xaa11'de; Pro, Xaa13'te; Arg, Xaa15'te; Ala, Xaa16'da; Ala, Xaa17'de; His, Xaa18'de; Pro, Xaa19'da; Trp, Xaa21'de; Phe, Xaa22'de; Phe, Xaa23'te; Glu, Xaa31'de; Glu, Xaa32'de; Ile, Xaa34'te; Tyr, Xaa35'te; Glu, Xaa39'da; Gly, Xaa40'ta; Asn, Xaa43'te; ve Phe, Xaa45'te.
- 25 E38. E6'ya göre yöntem olup, burada Xaa3 Ser'dir.
- E39. E6'ya göre yöntem olup, burada Xaa2 His'tir.
- 30 E40. E6'ya göre yöntem olup, burada Xaa1 Met'tir.
- E41. E6'ya göre yöntem olup, burada Xaa56 Thr'dir.
- 35 E42. E6'ya göre yöntem olup, burada Xaa57 Arg'dir.

- E43. E6'ya göre yöntem olup, burada Xaa58 Asp'dir.
- 5 E44. E6'ya göre yöntem olup, burada kallikrein inhibitörü SEKANS KİMLİK NUMARASI:2'nin 3-60 amino asitlerini içeren bir polipeptittir.
- E45. E6'ya göre yöntem olup, burada kallikren inhibitörü, SEKANS KİMLİK NUMARASI:2'yi içeren bir polipeptittir.
- 10 E46. E6'ya göre yöntem olup, burada organ veya doku kalp, akciğer, böbrek, pancreas, karaciğer, böbrek, endotelial doku, vasküler doku veya cilttir.
- 15 E47. Bir sujeden organın çıkarılmasından ve/veya ameliyat sırasında bir organın reperfüzyon hasarının azaltılmasına yönelik bir yöntem olup, organın bir organ saklama ve muhafaza etme çözeltisi içerisine koyulması içermektedir, burada çözelti bir kallikrein inhibitörüdür.
- 20 E48. E47'ye göre yöntem olup, burada kallikrein inhibitörü SEKANS KİMLİK NUMARASI:1'i içeren bir polipeptittir, burada Xaa1, Xaa2, Xaa3, Xaa4, Xaa56, Xaa57 veya Xaa58 bireysel olarak bir amino asittir veya mevcut değildir;
Xaa6, Xaa7, Xaa8, Xaa9, Xaa20, Xaa24, Xaa25, Xaa26, Xaa27, Xaa28, Xaa29, Xaa41, Xaa42, Xaa44, Xaa46, Xaa47, Xaa48, Xaa49, Xaa50, Xaa52, Xaa53 ve Xaa54 herhangi bir amino asit olabilmektedir;
Xaa10 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Asp ve Glu;
25 Xaa11 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Asp, Gly, Ser, Val, Asn, Ile, Ala ve Thr;
Xaa13 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Arg, His, Pro, Asn, Ser, Thr, Ala, Gly, Lys ve Gln;
Xaa15 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Arg, Lys, Ala, Ser, Gly, Met,
30 Asn ve Gln;
Xaa16 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Ala, Gly, Ser, Asp ve Asn;
Xaa17 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Ala, Asn, Ser, Ile, Gly, Val, Gln ve Thr;
Xaa18 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: His, Leu, Gln ve Ala;
35 Xaa19 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Pro, Gln, Leu, Asn ve Ile;

- Xaa21 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Trp, Phe, Tyr, His ve Ile;
Xaa22 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Tyr ve Phe;
Xaa23 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Tyr ve Phe;
Xaa31 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Ala,
5 Val, Leu, Ile ve Thr;
Xaa32 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Glu, Gln, Asp Asn, Pro, Thr,
Leu, Ser, Ala, Gly ve Val;
Xaa34 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Thr, Ile, Ser, Val, Ala, Asn,
Gly ve Leu;
10 Xaa35 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Tyr, Trp ve Phe;
Xaa39 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Glu, Gly, Ala, Ser ve Asp;
Xaa40 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Gly ve Ala;
Xaa43 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Asn ve Gly;
Xaa 45 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Phe ve Tyr.
15
- E49. E47'ye göre yöntem olup, burada kallikrein inhibitörü SEKANS KİMLİK
NUMARASI:2'nin 3-60 amino asitlerini içeren bir polipeptittir.
- E50. E47'ye göre yöntem olup, burada kallikrein inhibitörü SEKANS KİMLİK NUMARASI:2'yi
20 içeren bir polipeptittir.
- E51. E47'ye göre yöntem olup, burada organ veya doku kalp, akciğer, böbrek, pancreas,
karaciğer, bağırsak, endotelial doku, vasküler doku veya cilttir.
- 25 E52. Bir organın muhafaza edilmesi ve/veya saklanmasıya yönelik bir bileşim olup, yandaki
amino asit sekansını içeren bir polipeptite sahip fizyolojik olarak kabul edilebilir bir ex
vivo organ muhafaza çözeltisi içermektedir: Xaa1 Xaa2 Xaa3 Xaa4 Cys Xaa6 Xaa7
Xaa8 Xaa9 Xaa10 Xaa11 Gly Xaa13 Cys Xaa15 Xaa16 Xaa17 Xaa18 Xaa19 Xaa20
Xaa21 Xaa22 Xaa23 Xaa24 Xaa25 Xaa26 Xaa27 Xaa28 Xaa29 Cys Xaa31 Xaa32 Phe
30 Xaa34 Xaa35 Gly Gly Cys Xaa39 Xaa40 Xaa41 Xaa42 Xaa43 Xaa44 Xaa45 Xaa46 Xaa47
Xaa48 Xaa49 Xaa50 Cys Xaa52 Xaa53 Xaa54 Cys Xaa56 Xaa57 Xaa58 (SEKANS KİMLİK
NUMARASI:1), burada
Xaa1, Xaa2, Xaa3, Xaa4, Xaa56, Xaa57 veya Xaa58 bireysel olarak bir amino asittir
veya mevcut değildir;
35 Xaa6, Xaa7, Xaa8, Xaa9, Xaa20, Xaa24, Xaa25, Xaa26, Xaa27, Xaa28, Xaa29, Xaa41,

Xaa42, Xaa44, Xaa46, Xaa47, Xaa48, Xaa49, Xaa50, Xaa52, Xaa53 ve Xaa54 herhangi bir amino asit olabilmektedir;

Xaa10 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Asp ve Glu;

Xaa11 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Asp, Gly, Ser, Val, Asn, Ile, Ala ve Thr;

Xaa13 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Arg, His, Pro, Asn, Ser, Thr, Ala, Gly, Lys ve Gln;

Xaa15 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Arg, Lys, Ala, Ser, Gly, Met, Asn ve Gln;

Xaa16 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Ala, Gly, Ser, Asp ve Asn;

Xaa17 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Ala, Asn, Ser, Ile, Gly, Val, Gln ve Thr;

Xaa18 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: His, Leu, Gln ve Ala;

Xaa19 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Pro, Gln, Leu, Asn ve Ile;

Xaa21 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Trp, Phe, Tyr, His ve Ile;

Xaa22 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Tyr ve Phe;

Xaa23 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Tyr ve Phe;

Xaa31 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Ala, Val, Leu, Ile ve Thr;

Xaa32 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Glu, Gln, Asp, Asn, Pro, Thr, Leu, Ser, Ala, Gly ve Val;

Xaa34 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Thr, Ile, Ser, Val, Ala, Asn, Gly ve Leu;

Xaa35 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Tyr, Trp ve Phe;

Xaa39 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Glu, Gly, Ala, Ser ve Asp;

Xaa40 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Gly ve Ala;

Xaa43 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Asn ve Gly;

Xaa45 şunlardan oluşan gruptan seçilen bir amino asittir: Phe ve Tyr; ve burada söz konusu polipeptit kallikreini inibe etmektedir.

E53. E52'ye göre bileşim olup, burada Xaa6 Ala'dır.

E54. E52'ye göre bileşim olup, burada Xaa7 Phe'dir.

E55. E52'ye göre bileşim olup, burada Xaa8 Lys'dir.

E56. E52'ye göre bileşim olup, burada Xaa9 Ala'dır

E57. E52'ye göre bileşim olup, burada Xaa10 Asp'dir.

5

E58. E52'ye göre bileşim olup, burada Xaa11 Asp'dir.

E59. E52'ye göre bileşim olup, burada Xaa13 Pro'dur, Xaa15 Arg'dir, Xaa16 Ala'dır Xaa17 Ala'dır, Xaa18 His'tir ve Xaa19 ise Pro'dur.

10

E60. E52'ye göre bileşim olup, burada Xaa20 Arg'dir.

E61. E52'ye göre bileşim olup, burada Xaa24 Asn'dir.

15 E62. E52'ye göre bileşim olup, burada Xaa25 Ile'dir.

E63. E52'ye göre bileşim olup, burada Xaa26 Phe'dir.

E64. E52'ye göre bileşim olup, burada Xaa27 Thr'dir.

20

E65. E52'ye göre bileşim olup, burada Xaa28 Arg'dir.

E66. E52'ye göre bileşim olup, burada Xaa29 Gln'dir.

25 E67. E52'ye göre bileşim olup, burada Xaa31 Glu'dur.

E68. E52'ye göre bileşim olup, burada Xaa32 Glu'dur.

E69. E52'ye göre bileşim olup, burada Xaa34 Ile'dir.

30

E70. E52'ye göre bileşim olup, burada Xaa35 Tyr'dir.

E71. E52'ye göre bileşim olup, burada Xaa39 Glu'dur.

35 E72. E52'ye göre bileşim olup, burada Xaa41 Asn'dir.

E73. E52'ye göre bileşim olup, burada Xaa42 Arg'dir.

E74. E52'ye göre bileşim olup, burada Xaa44 Arg'dir.

5

E75. E52'ye göre bileşim olup, burada Xaa46 Glu'dur.

E76. E52'ye göre bileşim olup, burada Xaa47 Ser'dir.

10 E77. E52'ye göre bileşim olup, burada Xaa48 Leu'dur.

E78. E52'ye göre bileşim olup, burada Xaa49 Glu'dur.

E79. E52'ye göre bileşim olup, burada Xaa50 Glu'dur.

15

E80. E52'ye göre bileşim olup, burada polipeptit, şunlardan oluşan gruptan seçilen iki veya daha fazla amino asit içermektedir: Asp, Xaa10'da; Asp, Xaa11'de; Pro, Xaa13'te; Arg , Xaa15'te; Ala, Xaa16'da; Ala, Xaa17'de; His, Xaa18'de; Pro, Xaa19'da; Trp, Xaa21'de; Phe, Xaa22'de; Phe, Xaa23'te; Glu, Xaa31'de; Glu, Xaa32'de; Ile, Xaa34'te; Tyr, Xaa35'de; Glu, Xaa39'da; Gly, Xaa40'ta; Asn, Xaa43'te; ve Phe, Xaa45'te.

20

E81. E52'ye göre bileşim olup, burada polipeptit şunlardan oluşan gruptan seçilen beş veya daha fazla amino asit içermektedir: : Asp, Xaa10'da; Asp, Xaa11'de; Pro, Xaa13'te; Arg , Xaa15'te; Ala, Xaa16'da; Ala, Xaa17'de; His, Xaa18'de; Pro, Xaa19'da; Trp, Xaa21'de; Phe, Xaa22'de; Phe, Xaa23'te; Glu, Xaa31'de; Glu, Xaa32'de; Ile, Xaa34'te; Tyr, Xaa35'te; Glu, Xaa39'da; Gly, Xaa40'ta; Asn, Xaa43'te; ve Phe, Xaa45'te.

25

E82. E52'ye göre bileşim olup, burada polipeptit şunlardan oluşan gruptan seçilen on veya daha fazla amino asit içermektedir: Asp, Xaa10'da; Asp, Xaa11'de; Pro, Xaa13'te; Arg , Xaa15'te; Ala, Xaa16'da; Ala, Xaa17'de; His, Xaa18'de; Pro, Xaa19'da; Trp, Xaa21'de; Phe, Xaa22'de; Phe, Xaa23'te; Glu, Xaa31'de; Glu, Xaa32'de; Ile, Xaa34'te; Tyr, Xaa35'te; Glu, Xaa39'da; Gly, Xaa40'ta; Asn, Xaa43'te; ve Phe, Xaa45'te.

30

E83. E52'ye göre bileşim olup, burada polipeptit şunlardan oluşan gruptan seçilen on eş veya daha fazla amino asit içermektedir: Asp, Xaa10'da; Asp, Xaa11'de; Pro, Xaa13'te;

35

Arg, Xaa15'te; Ala, Xaa16'da; Ala, Xaa17'de; His, Xaa18'de; Pro, Xaa19'da; Trp, Xaa21'de; Phe, Xaa22'de; Phe, Xaa23'te; Glu, Xaa31'de; Glu, Xaa32'de; Ile, Xaa34'te; Tyr, Xaa35'te; Glu, Xaa39'da; Gly, Xaa40'ta; Asn, Xaa43'te; ve Phe, Xaa45'te.

5 E84. E52'ye göre bileşim olup burada Xaa3 Ser'dir.

E85. E52'ye göre bileşim olup burada Xaa2 His'tir.

E86. E52'ye göre bileşim olup burada Xaa1 Met'tir.

10

E87. E52'ye göre bileşim olup burada Xaa56 Thr'dir.

E88. E52'ye göre bileşim olup burada Xaa57 Arg'dir.

15 E89. E52'ye göre bileşim olup burada Xaa58 Asp'dir.

E90. E52'ye göre bileşim olup burada polipeptit SEKANS KİMLİK NUMARASI:2'yi içermektedir.

20 E91. Bir organ veya dounun muhafaza edilmesine yönelik bir yöntem olup, organ veya dokunun, bir kallikrein bağlama peptide içeren fizyolojik olarak Kabul edilebilir bir *ex vivo* organ muhafaza çözeltisi ile temas ettirilmesini içermektedir.

25 E92. E91'e göre yöntem olup, burada kallikrein bağlama polipeptiti SEKANS KİMLİK NUMARASI:2'yi içermektedir.

E93. E91'e göre yöntem olup, burada organ veya doku kalp, akciğer, böbren, pankreasi karaciğer, bağışak, endotelyal doku, vasküler doku veya cilttir.

30 E94. E91'e göre yöntem olup, burada kallikrein bağlama polipeptiti bir Kunitz alanı içermektedir.

E95. E94'e öre yöntem olup, burada Kunitz alanı pozisyonlar 5 ve 55; 14 ve 38; ve 30 ve 51'den her birindeki bir sisteini içermektedir ve ayrıca aşağıdakileri de içermektedir:

35

His ve Pro'dan seçilen 13 numaralı amino asit;

Ala ve Gly'den seçilen 16 numaralı amino asit;

Asn ve Ser'den seçilen 17 numaralı amino asit;

His ve Leu'dan seçilen 18 numaralı amino asit; ve

5 Gln, Leu ve Pro'dan seçilen 19 numaralı amino asit (SEKANS KİMLİK NUMARASI:23)

burada amino asit numarası, sağ pankreatik tripsin inhibitörünün (BPTI) Kunitz alan amino asit pozisyonlarına karşı gelmektedir.

10 E96. E94'e göre yöntem olup, burada Kunitz alan pozisyonlar 5 ve 55; 14 ve 38; ve 30 ve 51'den her birindeki bir sisteini içermektedir ve ayrıca aşağıdakileri içermektedir:

His ve Pro'dan seçilen 13 numaralı amino asit;

Lys ve Arg'den seçilen 15 numaralı amino asit;

15 Ala ve Gly'den seçilen 16 numaralı amino asit;

Ala, Asn ve Ser'den seçilen 17 numaralı amino asit;

His ve Leu'dan seçilen 18 numaralı amino asit;

Gln, Leu ve Pro'dan seçilen 19 numaralı amino asit;

31 numaralı amino asit Glu'dur;

20 Glu ve Gln'den seçilen 32 numaralı amino asit;

Ser, Thr ve Ile'den seçilen 34 numaralı amino asit; ve

Gly, Gly ve Ala'dan seçilen 39 numaralı amino asit (SEKANS KİMLİK NUMARASI:24),

burada amino asit numarası, sağ pankreatik tripsin inhibitörünün (BPTI) Kunitz alan amino asitlerine karşı gelmektedir.

25

E97. E94'e göre yöntem olup, burada Kunitz alan aşağıdakilerden oluşan gruptan seçilmektedir

KKII/3 #1 (SEKANS KİMLİK NUMARASI:24)

30 KKII/3 #2 (SEKANS KİMLİK NUMARASI:25)

KKII/3 #3 (SEKANS KİMLİK NUMARASI:26)

KKII/3 #4 (SEKANS KİMLİK NUMARASI:27)

KKII/3 #5 (SEKANS KİMLİK NUMARASI:28)

KKII/3 #6 (SEKANS KİMLİK NUMARASI:29)

35 KKII/3 #7 (SEKANS KİMLİK NUMARASI:30)

KKII/3 #8 (SEKANS KİMLİK NUMARASI:31)
KKII/3 #9 (SEKANS KİMLİK NUMARASI:32) ve
KKII/3 #10 (SEKANS KİMLİK NUMARASI:33).

5 SEKANS LİSTESİ

<110> Dyax Corp. Cicardi, Marco Bergamaschini, Luigi
<120> Organların ve Dokuların Muhafaza Edilmesine Yönelik Yöntem
10 <130> 3421.1000003
<140> PCT/US03/17802
<141> 2003-06-06
15 <150> US 60/407,004
<151> 2002-08-28
<160> 41
20 <170> Windows Versiyon 4.0 için FastSEQ
<210> 1
<211> 58
25 <212> PRT
<213> Yapay Sekans
<220>
<223> Kalıp Protein
30 <221> DEĞİŞKEN
<222> 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 20, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 41,
42, 44, 46, 47, 48, 49, 50, 52, 53, 54, 56, 57, 58
<223> Xaa = Herhangi bir Amino Asit
35 <221> DEĞİŞKEN
<222> 10
<223> Xaa = Asp veya Glu
40 <221> DEĞİŞKEN
<222> 11
<223> Xaa = Asp, Gly, Ser, Val, Asn, Ile, Ala veya Thr
<221> DEĞİŞKEN
45 <222> 13
<223> Xaa = Arg, His, Pro, Asn, Ser, Thr, Ala, Gly, Lys veya Gln
<221> DEĞİŞKEN
<222> 15
50 <223> Xaa = Arg, Lys, Ala, Ser, Gly, Met, Asn veya Gln
<221> DEĞİŞKEN
<222> (16)...(16)
<223> Xaa = Ala, Gly, Ser, Asp veya Asn
55 <221> DEĞİŞKEN
<222> (17)...(17)
<223> Xaa = Ala, Asn, Ser, Ile, Gly, Val, Gln veya Thr

<221> DEĞİŞKEN
 <222> (18)...(18)
 <223> Xaa = His, Leu, Gln veya Ala
 5
 <221> DEĞİŞKEN
 <222> (19)...(19)
 <223> Xaa = Pro, Gln, Leu, Asn veya Ile
 10
 <221> DEĞİŞKEN
 <222> (21)...(21)
 <223> Xaa = Trp, Phe, Tyr, His veya Ile
 15
 <221> DEĞİŞKEN
 <222> (22)...(23)
 <223> Xaa = Tyr veya Phe
 20
 <221> DEĞİŞKEN
 <222> (31)...(31)
 <223> Xaa = Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Ala, Val, Leu, Ile veya Thr
 25
 <221> DEĞİŞKEN
 <222> (32)...(32)
 <223> Xaa = Glu, Gln, Asp, Asn, Pro, Thr, Leu, Ser, Ala, Gly veya Val
 30
 <221> DEĞİŞKEN
 <222> (34)...(34)
 <223> Xaa = Thr, Ile, Ser, Val, Ala, Asn, Gly veya Leu
 35
 <221> DEĞİŞKEN
 <222> (35)...(35)
 <223> Xaa = Tyr, Trp veya Phe
 40
 <221> DEĞİŞKEN
 <222> (39)...(39)
 <223> Xaa = Glu, Gly, Ala, Ser veya Asp
 45
 <221> DEĞİŞKEN
 <222> (40)...(40)
 <223> Xaa = Gly veya Ala
 50
 <221> DEĞİŞKEN
 <222> (43)...(43)
 <223> Xaa = Asn veya Gly
 55
 <221> DEĞİŞKEN
 <222> (45)...(45)
 <223> Xaa = Phe veya Tyr
 60
 <400> 1
 Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Cys Xaa Xaa
 1 5 10 15
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa
 20 25 30
 Phe Xaa Xaa Gly Gly Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45
 Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa
 50 55

<210> 2
 <211> 60
 <212> PRT
 <213> Yapay Sekans

5

<220>
 <223> İzole Edilmiş Bağlayıcı Peptit

<400> 2

10

Glu Ala Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys
 1 5 10 15
 Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys
 20 25 30

15

Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu
 35 40 45
 Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55 60

20

<210> 3
 <211> 179
 <212> DNA
 <213> Yapay Sekans

25

<220>
 <223> Pep-1 Kodlama Sekansı

<400> 3

30

gaggetatgc actctttctg tgctttcaag gctgacgacg gtcgtgcaga gctgctcacc 60
 caagatgggtt ctccaacatc ttcaacgcgc aatgcgagga gttcatctac ggtgggttg 120
 agggtaacca aaacagattc gagtctctag aggagtgtaa gaagatgtgt actagagac 179

35

<210> 4
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Yapay Sekans

40

<220>
 <223> İzole Edilmiş Bağlayıcı Peptit

<400> 4

45

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Lys Ala
 1 5 10 15
 Asn His Leu Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45

50

Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55

55

<210> 5
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Yapay Sekans

60

<220>
 <223> İzole Edilmiş Bağlayıcı Peptit

<400> 5

5 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala
1 5 10 15
Asn His Gln Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
20 25 30
Phe Thr Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
35 40 45
10 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
50 55

<210> 6

15 <211> 58
<212> PRT
<213> Yapay Sekans

<220>

20 <223> İzole Edilmiş Bağlayıcı Peptit

<400> 6

25 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala
1 5 10 15
Asn His Gln Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
20 25 30
Phe Thr Tyr Gly Gly Cys Ala Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
35 40 45
30 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
50 55

<210> 7

35 <211> 58
<212> PRT
<213> Yapay Sekans

<220>

40 <223> İzole Edilmiş Bağlayıcı Peptit

<400> 7

45 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala
1 5 10 15
Ser Leu Pro Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
20 25 30
Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
35 40 45
50 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
50 55

<210> 8

55 <211> 58
<212> PRT
<213> Yapay Sekans

<220>

60 <223> İzole Edilmiş Bağlayıcı Peptit

<400> 8

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala
1 5 10 15
5 Asn His Gln Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
20 25 30
Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
35 40 45
10 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
50 55

<210> 9

<211> 58

15 <212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

20 <223> İzole Edilmiş Bağlayıcı Peptit

<400> 9

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Gly
1 5 10 15
25 Ala His Leu Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
20 25 30
Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
35 40 45
30 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
50 55

<210> 10

<211> 58

35 <212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

40 <223> İzole Edilmiş Bağlayıcı Peptit

<400> 10

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Arg Cys Lys Gly
1 5 10 15
45 Ala His Leu Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
20 25 30
Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
35 40 45
50 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
50 55

<210> 11

<211> 58

55 <212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

60 <223> İzole Edilmiş Bağlayıcı Peptit

<400> 11

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Gly Gly Arg Cys Arg Gly
1 5 10 15
Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
20 25 30
5 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
35 40 45
Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
50 55

10
<210> 12
<211> 58
<212> PRT
<213> Yapay Sekans

15
<220>
<223> İzole Edilmiş Bağlayıcı Peptit

20
<400> 12

25
Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala
1 5 10 15
Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
20 25 30
Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
35 40 45
Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
50 55

30
<210> 13
<211> 58
<212> PRT
<213> Yapay Sekans

35
<220>
<223> İzole Edilmiş Bağlayıcı Peptit

40
<400> 13

45
Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Val Gly Arg Cys Arg Gly
1 5 10 15
Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
20 25 30
Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
35 40 45
Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
50 55

50
<210> 14
<211> 58
<212> PRT
<213> Yapay Sekans

55
<220>
<223> İzole Edilmiş Bağlayıcı Peptit

60
<400> 14

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Val Gly Arg Cys Arg Gly
 1 5 10 15
 Ala Gln Pro Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 5 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55
 10
 <210> 15
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Yapay Sekans
 15
 <220>
 <223> İzole Edilmiş Bağlayıcı Peptit
 <400> 15
 20
 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Ser Cys Arg Ala
 1 5 10 15
 Ala His Leu Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 25 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55
 30
 <210> 16
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Yapay Sekans
 35
 <220>
 <223> İzole Edilmiş Bağlayıcı Peptit
 <400> 16
 40
 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Glu Gly Gly Ser Cys Arg Ala
 1 5 10 15
 Ala His Gln Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 45 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55
 50
 <210> 17
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Yapay Sekans
 55
 <220>
 <223> İzole Edilmiş Bağlayıcı Peptit
 <400> 17
 60

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Gly
 1 5 10 15
 Ala His Leu Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 5 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55
 10
 <210> 18
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Yapay Sekans
 15
 <220>
 <223> İzole Edilmiş Bağlayıcı Peptit
 <400> 18
 20
 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Arg Gly
 1 5 10 15
 Ala Leu Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 25 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55
 30
 <210> 19
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Yapay Sekans
 35
 <220>
 <223> İzole Edilmiş Bağlayıcı Peptit
 <400> 19
 40
 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Ser Gly Asn Cys Arg Gly
 1 5 10 15
 Asn Leu Pro Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 45 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55
 50
 <210> 20
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Yapay Sekans
 55
 <220>
 <223> İzole Edilmiş Bağlayıcı Peptit
 <400> 20
 60

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Ser Gly Arg Cys Arg Gly
 1 5 10 15
 Asn His Gln Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 5 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55
 10
 <210> 21
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Yapay Sekans
 15
 <220>
 <223> İzole Edilmiş Bağlayıcı Peptit
 <400> 21
 20
 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Gly Gly Arg Cys Arg Ala
 1 5 10 15
 Ile Gln Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 25 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55
 30
 <210> 22
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Yapay Sekans
 35
 <220>
 <223> İzole Edilmiş Bağlayıcı Peptit
 <400> 22
 40
 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Arg Cys Arg Gly
 1 5 10 15
 Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 45 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55
 50
 <210> 23
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Yapay Sekans
 55
 <220>
 <223> İzole Edilmiş Bağlayıcı Peptit
 <400> 23
 60

Arg Pro Asp Phe Cys Leu Glu Pro Pro Tyr Thr Gly Pro Cys Lys Ala
 1 5 10 15
 Arg Ile Ile Arg Tyr Phe Tyr Asn Ala Lys Ala Gly Leu Cys Gln Thr
 20 25 30
 5 Phe Val Tyr Gly Gly Cys Arg Ala Lys Arg Asn Asn Phe Lys Ser Ala
 35 40 45
 Glu Asp Cys Met Arg Thr Cys Gly Gly Ala
 50 55
 10
 <210> 24
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Yapay Sekans
 15
 <220>
 <223> İzole Edilmiş Bağlayıcı Peptit
 <400> 24
 20
 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala
 1 5 10 15
 Ser Leu Pro Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 25 Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55
 30
 <210> 25
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Yapay Sekans
 35
 <220>
 <223> İzole Edilmiş Bağlayıcı Peptit
 <400> 25
 40
 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Lys Ala
 1 5 10 15
 Asn His Leu Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 45 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55
 50
 <210> 26
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Yapay Sekans
 55
 <220>
 <223> İzole Edilmiş Bağlayıcı Peptit
 <400> 26
 60

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala
 1 5 10 15
 Asn His Gln Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 5 Phe Thr Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55
 10
 <210> 27
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Yapay Sekans
 15
 <220>
 <223> İzole Edilmiş Bağlayıcı Peptit
 <400> 27
 20
 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala
 1 5 10 15
 Asn His Gln Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Gln
 20 25 30
 25 Phe Thr Tyr Gly Gly Cys Ala Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55
 30
 <210> 28
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Yapay Sekans
 35
 <220>
 <223> İzole Edilmiş Bağlayıcı Peptit
 <400> 28
 40
 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala
 1 5 10 15
 Ser Leu Pro Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 45 Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55
 50
 <210> 29
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Yapay Sekans
 55
 <220>
 <223> İzole Edilmiş Bağlayıcı Peptit
 <400> 29
 60

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala
 1 5 10 15
 Asn His Gln Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 5 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55
 10
 <210> 30
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Yapay Sekans
 15
 <220>
 <223> İzole Edilmiş Bağlayıcı Peptit
 <400> 30
 20
 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala
 1 5 10 15
 Asn His Gln Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 25 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55
 30
 <210> 31
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Yapay Sekans
 35
 <220>
 <223> İzole Edilmiş Bağlayıcı Peptit
 <400> 31
 40
 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala
 1 5 10 15
 Asn His Gln Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
 20 25 30
 45 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55
 50
 <210> 32
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Yapay Sekans
 55
 <220>
 <223> İzole Edilmiş Bağlayıcı Peptit
 <400> 32
 60

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Ala
1 5 10 15
Asn His Gln Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
20 25 30
5 Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
35 40 45
Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
50 55

10
<210> 33
<211> 58
<212> PRT
<213> Yapay Sekans

15
<220>
<223> İzole Edilmiş Bağlayıcı Peptit

20
<400> 33

25
Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly His Cys Lys Gly
1 5 10 15
Ala His Leu Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
20 25 30
Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
35 40 45
Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
50 55

30
<210> 34
<211> 58
<212> PRT
<213> Yapay Sekans

35
<220>
<223> İzole Edilmiş Bağlayıcı Peptit

40
<400> 34

45
Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Lys Ala
1 5 10 15
Ile Met Lys Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
20 25 30
Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
35 40 45
Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
50 55

50
<210> 35
<211> 548
<212> DNA
<213> Yapay Sekans

55
<220>
<223> Füzyon proteini için kodlama sekansı

60
<221> CDS
<222> (54)...(488)

<400> 35

```
cgacttttaa cgacaacttg agaagatcaa aaaacaacta attattcgaa acg atg      56
                                     Met
5                                     1

aga ttc cca tct atc ttc act gct gtt ttg ttc gct gct tcc tct gct      104
Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser Ala
                                     5          10          15

10 ttg gct gct cca gtt aac acc act act gaa gac gag act gct caa att      152
Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln Ile
                                     20          25          30

15 cct gct gag gct gtc atc ggt tac tct gac ttg gaa ggt gac ttc gac      200
Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe Asp
                                     35          40          45

20 gtc gct gtt ttg cca ttc tct aac tct act aac aac ggt ttg ttg ttc      248
Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu Phe
                                     50          55          60          65

atc aac act acc atc gct tct atc gct gct aag gag gaa ggt gtt tcc      296
Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val Ser
25                                     70          75          80

ctc gag aag aga gag gct atg cac tct ttc tgt gct ttc aag gct gac      344
Leu Glu Lys Arg Glu Ala Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp
                                     85          90          95

30 gac ggt ccg tgc aga gct gct cac cca aga tgg ttc ttc aac atc ttc      392
Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe
                                     100          105          110

35 acg cgt caa tgc gag gag ttc atc tac ggt ggt tgt gag ggt aac caa      440
Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln
                                     115          120          125

40 aac aga ttc gag tct cta gag gag tgt aag aag atg tgt act aga gac      488
Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
130          135          140          145

tagtaagaat tcgccttaga catgactggt cctcagttca agttgggcac ttacgagaag 548

45
<210> 36
<211> 58
<212> PRT
<213> Yapay Sekans

50
<220>
<223> İzole Edilmiş Bağlayıcı Peptit

<221> DEĞİŞKEN
55 <222> 10
<223> Xaa = Asp veya Glu

<221> DEĞİŞKEN
<222> 11
60 <223> Xaa = Asp, Gly, Ser, Val, Asn, Ile, Ala veya Thr
```

<221> DEĞİŞKEN
 <222> 13
 <223> Xaa = Arg, His, Pro, Asn, Ser, Thr, Ala, Gly, Lys veya Gln

 5 <221> DEĞİŞKEN
 <222> 15
 <223> Xaa = Arg, Lys, Ala, Ser, Gly, Met, Asn veya Gln

 <221> DEĞİŞKEN
 10 <222> 16
 <223> Xaa = Ala, Gly, Ser, Asp veya Asn

 <221> DEĞİŞKEN
 <222> (17)...(17)
 15 <223> Xaa = Ala, Asn, Ser, Ile, Gly, Val, Gln veya Thr

 <221> DEĞİŞKEN
 <222> (18)...(18)
 <223> Xaa = His, Leu, Gln veya Ala
 20
 <221> DEĞİŞKEN
 <222> (19)...(19)
 <223> Xaa = Pro, Gln, Leu, Asn veya Ile

 25 <221> DEĞİŞKEN
 <222> (21)...(21)
 <223> Xaa = Trp, Phe, Tyr, His veya Ile

 <221> DEĞİŞKEN
 30 <222> (31)...(31)
 <223> Xaa = Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Ala, Val, Leu, Ile veya Thr

 <221> DEĞİŞKEN
 <222> (32)...(32)
 35 <223> Xaa = Glu, Gln, Asp, Asn, Pro, Thr, Leu, Ser, Ala, Gly veya Val

 <221> DEĞİŞKEN
 <222> (34)...(34)
 <223> Xaa = Thr, Ile, Ser, Val, Ala, Asn, Gly veya Leu
 40
 <221> DEĞİŞKEN
 <222> (35)...(35)
 <223> Xaa = Tyr, Trp veya Phe

 45 <221> DEĞİŞKEN
 <222> (39)...(39)
 <223> Xaa = Glu, Gly, Ala, Ser veya Asp

 <400> 36
 50
 Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Xaa Xaa Gly Xaa Cys Xaa Xaa
 1 5 10 15
 Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Xaa Xaa
 20 25 30
 55 Phe Xaa Xaa Gly Gly Cys Xaa Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
 35 40 45
 Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 50 55

 60 <210> 37

<211> 6
 <212> DNA
 <213> Yapay Sekans

5 <220>
 <223> Değiştirilmiş Klonlama Alanı

<400> 37
 ttcgaa 6

10 <210> 38
 <211> 8
 <212> DNA
 <213> Yapay Sekans

15 <220>
 <223> Değiştirilmiş Klonlama Alanı

<400> 38
 20 ttcgcgaa 8

<210> 39
 <211> 6
 <212> DNA
 25 <213> Yapay Sekans

<220>
 <223> Değiştirilmiş Klonlama Alanı

30 <400> 39
 gacgtc 6

<210> 40
 <211> 10
 35 <212> DNA
 <213> Yapay Sekans

<220>
 <223> Değiştirilmiş Klonlama Alanı

40 <400> 40
 gacgtacgtc 10

<210> 41
 45 <211> 145
 <212> PRT
 <213> Yapay Sekans

<220>
 50 <223> Füzyon Proteini

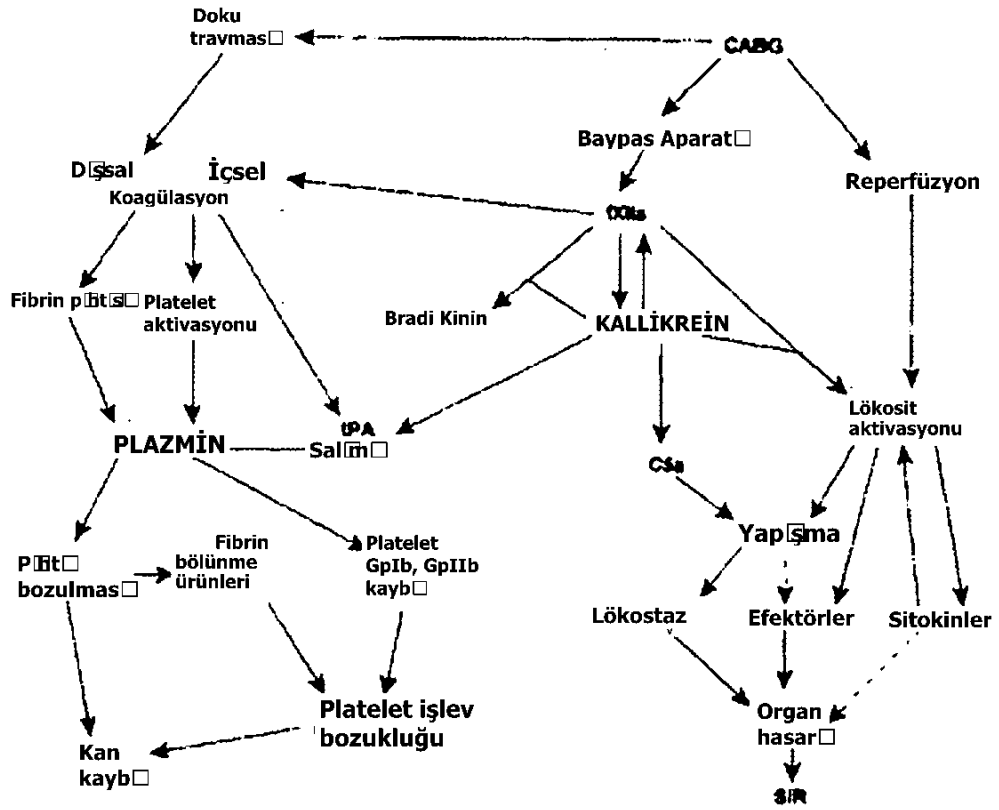
<400> 41

55 Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
 1 5 10 15
 Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
 20 25 30
 Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
 35 40 45
 60 Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
 50 55 60

	Phe	Ile	Asn	Thr	Thr	Ile	Ala	Ser	Ile	Ala	Ala	Lys	Glu	Glu	Gly	Val
	65					70					75					80
	Ser	Leu	Glu	Lys	Arg	Glu	Ala	Met	His	Ser	Phe	Cys	Ala	Phe	Lys	Ala
					85					90					95	
5	Asp	Asp	Gly	Pro	Cys	Arg	Ala	Ala	His	Pro	Arg	Trp	Phe	Phe	Asn	Ile
				100					105						110	
	Phe	Thr	Arg	Gln	Cys	Glu	Glu	Phe	Ile	Tyr	Gly	Gly	Cys	Glu	Gly	Asn
			115					120					125			
10	Gln	Asn	Arg	Phe	Glu	Ser	Leu	Glu	Glu	Cys	Lys	Lys	Met	Cys	Thr	Arg
		130					135					140				
	Asp															
	145															

15

Şekil 1



Şekil 2

SAOX1

-----+-----
 CG ACT TTT AAC GAC AAC TTG AGA AGA TCA AAA AAC AAC TAA TTA TTC GAA

BstE I

ACG ATG AGA TTC CCA TCT ATC TTC ACT GCT GTT TTG TTC GCT GCT
 M R F P S I F T A V L F A A

TCC TCT GCT TTG GCT GCT CCA GTT AAC ACC ACT ACT GAA GAC GAG ACT
 S S A L A A P V N T T T E D E T

GCT CAA ATT CCT GCT GAG GCT GTC ATC GGT TAC TCT GAC TTG GAA GGT
 A Q I P A E A V I G Y S D L E G

GAC TTC GAC GTC GCT GTT TTG CCA TTC TCT AAC TCT ACT AAC AAC GGT
 D F D V A V L P F S N S T N N G

TTG TTG TTC ATC AAC ACT ACC ATC GCT TCT ATC GCT GCT AAG GAG GAA
 L L F I N T T I A S I A A K E E

GGT GTT TCC CTC GAG AAG AGA GAG GCT ATG CAC TCT TTC TGT GCT TTC
 G V S L E K R E A M H S F C A F

AAG GCT GAC GAC GGT DCG TGC AGA GCT GCT CAC CCA AGA TGG TTC TTC
 K A D D G P C R A A H P R W F F

AAC ATC TTC ACG CGT CAA TGC GAG GAG TTC ATC TAC GGT GGT TGT GAG
 N I F T R Q C E E F I Y G G C E

GGT AAC CAA AAC AGA TTC GAG TCT CTA GAG GAG TGT AAG AAG ATG TGT
 G N Q N R F E S L E E C K K H C

EcoR I

ACT AGA GAC TAG TAA GAA TTC GCC TTA GAC ATG ACT GTT CCT CAG TTC
 T R D * *

 3' AOX1

AAG TTG GGC ACT TAC GAG AAG
 3' AOX1

Şekil 3

SEKANS KİMLİK NUMARASI 2:	----MHSFCAFKA-DDGPCRAAHPRWFFNI FTRQCEEFI YGG
SEKANS KİMLİK NUMARASI 4:	----MHSFCAFKA-DDGPCKANHLRFFFNIFTRQCEEF SYGG
SEKANS KİMLİK NUMARASI 5:	----MHSFCAFKA-DDGHCKANHQRFFFNIFTRQCEEF TYGG
SEKANS KİMLİK NUMARASI 6:	----MHSFCAFKA-DDGHCKANHQRFFFNIFTRQCEQFTYGG
SEKANS KİMLİK NUMARASI 7:	----MHSFCAFKA-DDGHCKASLPRFFFNIFTRQCEEFI YGG
SEKANS KİMLİK NUMARASI 8:	----MHSFCAFKA-DDGHCKANHQRFFFNIFTRQCEEF SYGG
SEKANS KİMLİK NUMARASI 9:	----MHSFCAFKA-DDGHCKGAHLRFFFNIFTRQCEEFI YGG
SEKANS KİMLİK NUMARASI 10:	----MHSFCAFKA-DDGRCKGAHLRFFFNIFTRQCEEFI YGG
SEKANS KİMLİK NUMARASI 11:	----MHSFCAFKA-DGGRCRGAHPRWFFNIFTRQCEEF SYGG
SEKANS KİMLİK NUMARASI 12:	----MHSFCAFKA-DDGPCRAAHPRWFFNIFTRQCEEF SYGG
SEKANS KİMLİK NUMARASI 13:	----MHSFCAFKA-DVGRCRGAHPRWFFNIFTRQCEEF SYGG
SEKANS KİMLİK NUMARASI 14:	----MHSFCAFKA-DVGRCRGAQPRFFNIFTRQCEEF SYGG
SEKANS KİMLİK NUMARASI 15:	----MHSFCAFKA-DDGSCRAAHLRWFFNIFTRQCEEF SYGG
SEKANS KİMLİK NUMARASI 16:	----MHSFCAFKA-EGGSCRAAHQRWFFNIFTRQCEEF SYGG
SEKANS KİMLİK NUMARASI 17:	----MHSFCAFKA-DDGPCRG AHLRFFFNIFTRQCEEF SYGG
SEKANS KİMLİK NUMARASI 18:	----MHSFCAFKA-DDGHCRGALPRWFFNIFTRQCEEF SYGG
SEKANS KİMLİK NUMARASI 19:	----MHSFCAFKA-DSGNCRGNLPRFFFNIFTRQCEEF SYGG
SEKANS KİMLİK NUMARASI 20:	----MHSFCAFKA-DSGRCRGNHQRFFFNIFTRQCEEF SYGG
SEKANS KİMLİK NUMARASI 21:	----MHSFCAFKA-DGGRCAIQPRWFFNIFTRQCEEF SYGG
SEKANS KİMLİK NUMARASI 22:	----MHSFCAFKA-DDGRCRGAHPRWFFNIFTRQCEEF SYGG

SEKANS KİMLİK NUMARASI 2: (devam□)	CEGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEKANS KİMLİK NUMARASI 4:(devam□)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEKANS KİMLİK NUMARASI 5: (devam□)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEKANS KİMLİK NUMARASI 6: (devam□)	CAGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEKANS KİMLİK NUMARASI 7: (devam□)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEKANS KİMLİK NUMARASI 8: (devam□)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEKANS KİMLİK NUMARASI 9: (devam□)	CEGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEKANS KİMLİK NUMARASI 10: (devam□)	CEGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEKANS KİMLİK NUMARASI 11:(devam□)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEKANS KİMLİK NUMARASI 12:(devam□)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEKANS KİMLİK NUMARASI 13:(devam□)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEKANS KİMLİK NUMARASI 14: (devam□)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEKANS KİMLİK NUMARASI 15: (devam□)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEKANS KİMLİK NUMARASI 16 : (devam□)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEKANS KİMLİK NUMARASI 17:(devam□)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEKANS KİMLİK NUMARASI 18:(devam□)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEKANS KİMLİK NUMARASI 19: (devam□)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEKANS KİMLİK NUMARASI 20:(devam□)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEKANS KİMLİK NUMARASI 21: (devam□)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD
SEKANS KİMLİK NUMARASI 22 (devam□)	CGGNQ--NRFESLEECKKMCTRD